

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular



TESIS DOCTORAL

**“Regulación de la expresión del VIH-1 por la
modulación de NF κ B/I κ B α . Modificaciones celulares
inducidas por la proteína Tat del VIH-1”**

María Rosa López Huertas

Memoria de Tesis doctoral presentada por

María Rosa López Huertas

para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Trabajo dirigido por los doctores:

José Alcamí Pertejo y María Teresa Coiras López

Unidad de Inmunopatología del SIDA
Instituto de Salud Carlos III

Madrid, Julio de 2008

El trabajo presentado en esta tesis doctoral se ha realizado en el Instituto de Salud Carlos III, gracias a la concesión de una beca predoctoral FIPSE (MPY 1056/04) y un contrato en prácticas financiado por el Plan Nacional del SIDA (MVI 1434 /05 – 5). Este proyecto ha sido financiado por la red VIRHOST de la Comunidad de Madrid, la red europea EUROPRISE, la red de investigación en SIDA (RIS) (RETIC RD06/0006) y los proyectos FIPSE 36584/06 y FIS PI040614.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	XI
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	XV
RESUMEN EN INGLÉS	XVI

INTRODUCCIÓN

1.- VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA	1
1.1.- Generalidades	1
1.2.- Estructura de la partícula viral	2
1.2.1.- Características del genoma viral	2
1.3.- Ciclo biológico del VIH	4
1.4.- Replicación del VIH	5
1.5.- Latencia y reactivación viral	6
1.6.- Activación del sistema inmune en la infección por VIH-1	7
2.- LA PROTEÍNA Tat DEL VIH-1	8
2.1.- Generalidades	8
2.2.- Funciones de la proteína Tat del VIH-1	9
2.2.1.- Papel de Tat en la transcripción del VIH-1	10
2.2.2.- Efecto de Tat sobre la regulación de la expresión de genes celulares	12
2.2.3.- Efecto de Tat sobre la activación de NF-κB	12
2.2.4.- Interacción de Tat con receptores celulares	13
2.2.5.- Papel de Tat en la apoptosis celular	13
2.2.6.- Relación de Tat con los componentes del citoesqueleto	14

3.- FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B.....	15
3.1.- Generalidades	15
3.2.- Regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B.....	16
4.- FAMILIA DE RECEPTORES TLR.....	19
4.1.- Generalidades	19
4.2.- Expresión de receptores TLR en células T	21
4.3.- Papel de los receptores TLR en la activación del VIH-1.....	22

OBJETIVOS	23
------------------------	-----------

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- MATERIALES	25
1.1.- Células	25
1.1.1.- Células T expandidas con PHA e IL-2 y linfocitos T CD ₄ ⁺ purificados	25
1.1.2.- Jurkat	25
1.1.3.- HEK 293T.....	25
1.1.4.- MT-2.....	25
1.2.- Medio de cultivo	26
1.3.- Anticuerpos	26
1.4.- Reactivos.....	27
1.5.- Sistemas comerciales	28
1.6.- Plásmidos	29
1.7.- Oligonucleótidos.....	31
1.8.- Sondas	31
1.9.- Tiras de gradientes de pH para ensayos de electroforesis de dos dimensiones y sondas para espectrometría de masas tipo MALDI	32
1.10.- Equipos.....	32
2.- MÉTODOS.....	33
2.1.- Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica.....	33
2.2.- Obtención y cultivo de células T expandidas con PHA e IL-2	33
2.3.- Obtención y cultivo de linfocitos T CD ₄ ⁺ CD ₂₅ ⁻ altamente purificados	33

2.4.- Obtención y cultivo de células Jurktat Tet-Off y células Jurkat-Tat.....	34
2.5.- Citometría de flujo.....	35
2.6.- Microscopía confocal	36
2.7.- Preparación de extractos proteínas citosólicas y nucleares	37
2.8.- Ensayo de retardo en gel.....	37
2.8.1.- Marcaje de la sonda - κ B	37
2.8.2.- Ensayo de unión ADN-proteína.....	38
2.9.- Ensayo de <i>Western-Blot</i>	38
2.10.- Ensayo de inmunoprecipitación	39
2.11.- Purificación de ADN plasmídico	39
2.12.- Sistemas de transfección.....	39
2.13.- Sistemas de infección viral	40
2.14.- Detección de la actividad luciferasa	41
2.15.- Detección de la actividad β -galactosidasa	41
2.16.- Detección de la proteína p24.....	42
2.17.- Purificación y detección del ARN total	42
2.17.1.- Purificación de ARN Total	42
2.17.2.- Detección de ARN Total.....	42
2.17.2.a.- RT-PCR para la amplificación de TLR2 e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	43
2.17.2.b.- RT-PCR para la amplificación de Tat	43
2.17.2.c.- Detección de productos de PCR.....	44
2.18.- Análisis del proteoma celular basado en electroforesis bidimensional y espectrometría de masas de tipo Maldi-MS(/MS).....	44
2.18.1- Ensayos de electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones	45
2.18.1.a.- Preparación de las muestras	45
2.18.1.b.- Marcaje de proteínas con fluoróforos para DIGE.....	45
2.18.1.c.- Electroforesis en 2D	45
2.18.1.d.- Tinción de plata de geles de poliacrilamida	47
2.18.1.e.- Adquisición y análisis de imágenes de los geles de plata.....	47
2.18.2.- Aislamiento de proteínas de geles 2D	48

2.18.3.- Espectrometría de masas de tipo MALDI-MS(/MS) y búsqueda de proteínas en bases de datos.....	48
2.19.- Análisis de la funcionalidad del citoesqueleto	49
2.19.1.- Migración linfocitaria	49
2.19.2.- Polimerización de Actina.....	49
2.19.3.- Ensayo de polarización celular.....	50
2.20.- Estudio de la apoptosis celular	50
2.20.1.- Análisis del ciclo celular	50
2.20.2.- Análisis de apoptosis temprana mediante Anexina V	50
2.21.- Análisis estadístico	51

RESULTADOS

1.- ESTUDIO DEL TRÁFICO NUCLEOCITOSÓLICO DE NF- κ B/I κ B α EN LINFOCITOS T CD $_4^+$ DE SANGRE PERIFÉRICA NO ACTIVADOS Y SU IMPLICACIÓN EN LA REPLICACIÓN DEL VIH-1	53
1.1.- Caracterización del estado de activación de las células T expandidas con PHA e IL-2.....	53
1.2.- Análisis de la distribución subcelular de I κ B α y p65/RelA en linfocitos T CD $_4^+$ no activados.....	55
1.3.- Caracterización de las interacciones entre p65/RelA e I κ B α en linfocitos T no activados.....	57
1.4.- Caracterización funcional de la actividad basal de NF- κ B en linfocitos T CD $_4^+$	59
2.- ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL VIH-1 A TRAVÉS DE LA ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR TLR2 EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA	62
2.1.- Análisis de la expresión de TLR2 inducida por PGN en células T.....	62
2.2.- Influencia del tratamiento con PGN sobre la activación de NF- κ B en células T	64
2.3. Análisis de la influencia de la activación con PGN en la transactivación del LTR del VIH-1 y en la replicación viral en linfocitos T	66

3.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES FUNCIONALES INDUCIDAS POR LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE LA PROTEÍNA Tat DEL VIH-1 EN CÉLULAS JURKAT.....68

3.1.- Generación y caracterización de células Jurkat que expresan la proteína Tat del VIH-1 constitutivamente.....68

3.1.1.- Análisis de la transactivación del LTR del VIH-1 en las células Jurkat-Tat69

3.1.2.- Estudio de la influencia de la expresión constitutiva de Tat en la activación de NF- κ B71

3.2.- Caracterización de las alteraciones funcionales inducidas por la expresión constitutiva de la proteína Tat del VIH-1 en células Jurkat.....74

3.2.1.- Análisis de las modificaciones inducidas en el citoesqueleto por la expresión constitutiva de Tat en células Jurkat74

3.2.2.- Análisis de la expresión constitutiva de Tat sobre la apoptosis en células Jurkat..... 79

DISCUSIÓN

1.- ESTUDIO DEL TRÁFICO NÚCLEO-CITOSÓLICO DE NF- κ B/I κ B α EN LINFOCITOS T CD₄⁺ DE SANGRE PERIFÉRICA NO ACTIVADOS Y SU IMPLICACIÓN EN LA REPLICACIÓN DEL VIH-181

1.1.- Distribución subcelular de I κ B α y p65/RelA en linfocitos T CD₄⁺ no activados82

1.2.- Importancia funcional de la actividad basal de NF- κ B en linfocitos T CD₄⁺83

2.- ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL VIH-1 A TRAVÉS DE LA ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR TLR2 EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA86

2.1.- Expresión de receptores TLR2 funcionales en células T.....86

2.2.- El tratamiento con PGN aumenta la replicación del VIH-1 en células T88

3.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES FUNCIONALES INDUCIDAS POR LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE LA PROTEÍNA Tat DEL VIH-1 EN CÉLULAS JURKAT.....	90
3.1.- La expresión constitutiva de Tat induce la activación de NF- κ B	91
3.2.- La expresión constitutiva de Tat induce alteraciones funcionales del citoesqueleto	92
3.3.- La expresión constitutiva de Tat protege frente a la apoptosis	95
 CONCLUSIONES.....	 99
 BIBLIOGRAFÍA	 101
 ANEXO I: ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON LA TESIS	

ÍNDICE DE FÍGURAS

Figura 1.- Estructura del VIH-1.....	2
Figura 2.- Genoma del VIH-1	4
Figura 3.- Ciclo biológico del VIH-1.....	4
Figura 4.- LTR del VIH-1	5
Figura 5.- Dominios de la proteína Tat del VIH-1 (isoforma 101 aminoácidos)	9
Figura 6.- Factores reclutados en la elongación de transcritos del VIH-1 mediada por Tat	11
Figura 7.- Dominios de la proteína p65/RelA	15
Figura 8.- Dominios de la proteína I κ B α	16
Figura 9.- Esquema de la regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B	17
Figura 10.- Activación de NF- κ B mediante la activación de receptores TLR a través de la ruta dependiente de MyD88.....	20
Figura 11.- Esquema del sistema de control de expresión Tet-Off	35
Figura 12.- Esquema general del análisis del proteoma basado en electroforesis bidimensional y espectrometría de masas de tipo Maldi-MS(/MS)	46
Figura 13.- Análisis fenotípico de células T expandidas a partir de PBMC humanas mediante tratamiento con PHA e IL-2	54

Figura 14.- Análisis de la capacidad de unión al ADN de NF- κ B en células T expandidas a partir de PBMC humanas mediante tratamiento con PHA e IL-2	54
Figura 15.- Localización subcelular de I κ B α y p65/RelA en linfocitos T CD $_4^+$	55
Figura 16.- Localización subcelular de las proteínas de fusión EYFP-I κ B α y EYFP-p65 en linfocitos T CD $_4^+$	56
Figura 17.- Análisis de la cinética de translocación nuclear de I κ B α en células T vivas	57
Figura 18.- Análisis de la distribución subcelular de los complejos NF- κ B/I κ B α en linfocitos T CD $_4^+$ y de la dependencia de los niveles I κ B α de la síntesis <i>de novo</i> de proteínas	58
Figura 19.- Influencia de la sobreexpresión de I κ B α en la transactivación del LTR del VIH-1 en linfocitos T CD $_4^+$ no activados.....	60
Figura 20.- Replicación del VIH-1 en linfocitos T CD $_4^+$ en situación basal o activados	61
Figura 21.- Expresión de ARNm de TLR2 en células T tratadas con PGN.....	62
Figura 22.- Expresión de TLR2 en células T tratadas con PGN	63
Figura 23.- Caracterización del subtipo de células T CD $_3^+$ que expresan TLR2	63
Figura 24.- Análisis de la localización subcelular de la proteína EYFP-p65 en células T tratadas con PGN	64
Figura 25.- Activación de NF- κ B en células T tratadas con PGN	65

Figura 26.- Transactivación del LTR del VIH-1 y replicación viral en células T estimuladas con PGN.....	67
Figura 27.- Expresión y localización subcelular de Tat en las células Jurkat-Tat.....	68
Figura 28.- Análisis del porcentaje de expresión de Tat en las células Jurkat establemente transfectadas con Tat.....	69
Figura 29.- Análisis de capacidad de transactivación de Tat en células Jurkat que expresan Tat constitutivamente	70
Figura 30.- Análisis de la transactivación del LTR del VIH-1 en células Jurkat-Tat	71
Figura 31.- Análisis de la transactivación dependiente de secuencias -κB en células Jurkat-Tat	72
Figura 32.- Estudio de la distribución subcelular de la proteína EYFP-p65 en células Jurkat-Tat.....	72
Figura 33.- Estudio de la activación de NF-κB en células Jurkat-Tat.....	73
Figura 34.- Análisis de las modificaciones inducidas en la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto por la expresión de Tat en células Jurkat.....	74
Figura 35.- Análisis de los cambios morfológicos inducidos por la expresión de Tat en células Jurkat	76
Figura 36.- Análisis de la capacidad de migración inducida por SDF-1α en las células Jurkat-Tat.....	77
Figura 37.- Análisis de la polarización celular en células Jurkat-Tat.....	78

Figura 38.- Análisis de la polimerización de actina en las células Jurkat-Tat	79
Figura 39.- Cuantificación de apoptosis en células Jurkat-Tat	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Genes del VIH-1 y funciones de las proteínas que codifican.....	3
Tabla 2.- PAMP más comunes y receptores TLR que los reconocen.....	19
Tabla 3.- Anticuerpos utilizados	26
Tabla 4.- Reactivos utilizados.....	27
Tabla 5.- Sistemas comerciales.....	28
Tabla 6.- Resumen de oligónucleótidos	31
Tabla 7.- Resumen de equipos.....	32
Tabla 8.- Resumen de las proteínas identificadas por espectrometría de masas tipo MALDI-MS/MS que se expresan diferencialmente en las células Jurkat-Tat con respecto al control.....	75

ABREVIATURAS

2D	2 dimensiones
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AP-1	Proteína activadora 1
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina bovina
CDK9	Quinasa 9 dependiente de ciclina
CMR1	Exportina-1
CMV	Citomegalovirus
CHAPS	3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
CHX	Cicloheximida
cpm	Cuentas por minuto
DC	Células dendríticas
DIGE	Electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones
dNTPs	Deoxinucleotidos trifosfatos
DOC	Deoxicolato sódico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
ERM	Ezrina-Radixina-Moesina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GFP	Proteína verde fluorescente
HBS	Tampón HEPES Salino
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IFN	Interferón
IKK	Complejo de las quinasas de I κ B
IL	Interleucina
IPG	Tiras de gradientes de pH
LMB	Leptomicina B
LPS	Lipopolisacárido
LTR	Repetición terminal larga
MnSOD	Manganasa superoxido dismutasa

MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MyD88	Gen 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide
NES	Secuencia de exportación nuclear
NF- κ B	Factor nuclear - κ B
NF-AT	Factor nuclear de células T activadas
NIK	Quinasa inducida por NF- κ B
NK	Natural Killer
NLS	Secuencia de localización nuclear
NP-40	Nonidet P-40
PAMP	Estructuras moleculares asociadas a patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón salino-fosfato
PCAF	Factor asociado a p300/CBP
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PGN	Peptidoglicado
PHA	Fitohemaglutinina
PKR	Proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
P-TEFb	Factor de elongación transcripcional positivo b
RT	Retrotranscriptasa
RT-PCR	Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SDF-1 α	Factor 1 α derivado de células estromales
SDS	Lauril sulfato sódico
TAR	Elemento de respuesta a la transactivación
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TBE	Tris borato EDTA
TBP	Proteína de unión a TATA

TCR	Receptor de la célula T
TFA	Ácido trifluoroacético
TGF	Factor de crecimiento tumoral
TIR	Dominio del receptor Toll/IL-1
TLR	Receptor de tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
TRE	Elemento de respuesta a tetraciclina/doxiciclina
tTA	Transactivador controlado por doxiciclina
URL	Unidades relativas de luz
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
SV-40	Virus simio 40
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido
YFP	Proteína fluorescente amarilla

RESUMEN

El inicio de la transcripción del VIH-1 está controlado por la unión de factores celulares y virales a secuencias reguladoras localizadas en el LTR del promotor viral, entre los que destacan el factor transcripcional celular NF- κ B y la proteína viral Tat.

La presencia de NF- κ B en el núcleo de células T activadas es esencial para la replicación del virus. Sin embargo, se ha confirmado la existencia de un tráfico núcleo-citoplasmático basal de NF- κ B e I κ B α en líneas celulares no linfoides así como la existencia de una replicación a bajo nivel del VIH-1 en células T no activadas. Por esta razón, se ha estudiado el tráfico núcleo-citoplasmático de NF- κ B e I κ B α y su papel en la replicación del VIH-1 en linfocitos T CD $_4^+$. Los resultados demuestran que en linfocitos T humanos no activados existe un tráfico núcleo-citoplasmático continuo de p65/RelA e I κ B α , y que los niveles de I κ B α se mantienen constantes gracias a la resíntesis continua de la proteína. Además, esta actividad basal de NF- κ B presente en linfocitos T CD $_4^+$ no activados fue capaz de inducir la replicación a bajo nivel del VIH.

Por otro lado, el factor NF- κ B puede ser activado tras la estimulación de los receptores TLR con componentes microbianos específicos. Estos receptores no sólo se expresan en células del sistema inmune innato y en los tejidos no inmunes que forman la primera barrera de protección frente a patógenos sino también en las células T. Por este motivo, se analizó la expresión del receptor TLR2 en células T y su papel en la replicación del VIH-1. Se observó que la expresión de TLR2 en los linfocitos T CD $_4^+$ es modulada por su propio ligando, peptidoglicano (PGN). El tratamiento de las células T con PGN indujo la activación de NF- κ B, y así incrementó la replicación del VIH-1.

La proteína Tat del HIV-1 además de ser imprescindible para la elongación del ARN viral también modifica diversas funciones en las células T infectadas. Las modificaciones celulares inducidas por la expresión intracelular de Tat se analizaron en células Jurkat establemente transfectadas con un vector de expresión de Tat. Las células Jurkat-Tat mostraron una elevada actividad basal de NF- κ B. Además, la expresión constitutiva de Tat modificó la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto. Como consecuencia de estas alteraciones se observó una mayor polimerización basal de actina y una menor capacidad migratoria en respuesta a SDF-1 α . Por último, la expresión intracelular constitutiva de Tat protegió a las células Jurkat frente a la apoptosis inducida por distintos estímulos.

RESUMEN EN INGLÉS

HIV-1 replication initiation is controlled by the binding of cellular and viral factors to regulatory sequences in the LTR, including the transcriptional factor NF- κ B and the viral protein Tat.

In activated T cells, nuclear NF- κ B is essential in HIV-1 replication. However, basal nucleo-cytoplasmatic traffic has been confirmed in non-lymphoid cell lines as well as a low level HIV-1 replication in non-activated T cells. Therefore, NF- κ B and I κ B α nucleo-cytoplasmatic traffic and its influence on HIV-1 replication was assessed in CD₄⁺ T lymphocytes. In non-activated human T lymphocytes there was a continuous basal nucleo-cytoplasmatic traffic, and I κ B α levels remained the same due to its continuous resynthesis. Moreover, NF- κ B basal activity existing in resting CD₄⁺ T lymphocytes was able to induce low level HIV-1 replication.

Additionally, NF- κ B is activated through TLRs specific stimulation with microbial components. These receptors are not only expressed in innate immune system cells and in non-immune tissues that constitute the first defence line against pathogens but also in T lymphocytes. Therefore, TLR2 expression and its role on HIV-1 replication was analyzed in human T cells. It is determined that TLR2 expression in CD₄⁺ T lymphocytes was modulated by its own ligand, peptidoglycan (PGN). Treatment of T cells with PGN induced NF- κ B activation through p65/RelA phosphorylation and I κ B α degradation, and consequently HIV-1 replication is enhanced.

HIV-1 Tat protein not only is essential to viral RNA elongation but also modify several functions in viral infected T cells. Cellular modifications induced by Tat intracellular expression were analyzed in Jurkat cells stably transfected with a Tat expressing vector. Jurkat-Tat cells showed a high NF- κ B activity. Moreover, constitutive expression of Tat modulated the expression of cytoskeleton related proteins. As a consequence of these modifications an increase in basal actin polimerization and a decrease in migratory capacity induced by SDF-1 α were assessed. Finally, intracellular constitutive expression of Tat Jurkat cells protected against apoptosis induced by different stimuli.

1.- VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

1.1- Generalidades

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se aisló por primera vez en 1983 en el Instituto Pasteur de París, a partir del ganglio linfático de un paciente que presentaba un cuadro de linfadenopatía generalizada (Barre-Sinoussi et al., 1983). En 1984 se describieron otros aislados procedentes de pacientes con SIDA (Levy et al., 1984; Popovic et al., 1984). Gracias a estudios de secuenciación del genoma viral, se demostró que se trataba de aislados distintos de un mismo retrovirus y en 1986 se agruparon bajo la denominación de VIH (Coffin et al., 1986).

El VIH pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae* (Gonda et al., 1985). La infección por el VIH origina un trastorno grave, progresivo e irreversible de la función inmune, cuya expresión final viene representada por la enfermedad que conocemos como SIDA. Bajo este término se agrupan una serie de infecciones oportunistas graves secundarias al déficit inmunitario ocasionado por la infección por el VIH, además de un conjunto de manifestaciones neurológicas y tumorales (Levy, 1993). Se han identificado dos tipos de VIH: el VIH-1 (Barre-Sinoussi et al., 1983), principal causante del SIDA en el mundo, y el VIH-2 (Clavel et al., 1986), localizado principalmente en África occidental y de menor patogenicidad (De Cock et al., 1993).

El VIH, como el resto de los *Lentivirus*, es capaz de infectar células de la estirpe macrofágica (Gendelman et al., 1989) y linfoide, siendo los linfocitos T CD_4^+ la principal diana celular (Psallidopoulos et al., 1989). Esto origina daños inmunológicos severos, así como alteraciones importantes en el sistema nervioso central, dando lugar a una patogenia extraordinariamente compleja (Pantaleo & Fauci, 1995). A lo largo de la infección por el VIH-1 se pueden establecer tres períodos. El primero, o fase de infección aguda, se desarrolla en las primeras semanas tras el contacto con el virus y se caracteriza por altos niveles de viremia y por una disminución de células T CD_4^+ en sangre periférica y especialmente por su destrucción en el sistema inmune asociado a mucosas (Appay & Sauce, 2008; Guadalupe et al., 2003; Pantaleo et al., 1993). A continuación, como consecuencia de una fuerte respuesta inmune durante la fase aguda de infección, la producción viral se reduce significativamente en sangre periférica y

comienza la fase de latencia clínica o fase crónica de la infección, aunque la replicación viral persiste en los tejidos linfoides. Esta fase es muy variable aunque su duración media es de 5 años y puede prolongarse hasta 10 años o más (Pantaleo & Fauci, 1995). Finalmente, en la mayoría de los pacientes no tratados, la infección del VIH-1 progresa a SIDA. En esta fase desciende el número de linfocitos T CD_4^+ , se eleva la carga viral, aparecen infecciones causadas por patógenos oportunistas y se pueden desarrollar tumores. La severidad de la enfermedad depende, entre otros, de la edad del paciente, la virulencia de la cepa viral así como de la presencia de co-infecciones con patógenos oportunistas (Fauci, 1993; Pantaleo et al., 1993).

1.2.- Estructura de la partícula viral

Los viriones del VIH-1 (Fig. 1) son partículas esféricas de 80-100 nm de diámetro. La envoltura viral tiene una estructura de bicapa lipoproteica que incluye componentes propios de la membrana celular de la célula infectada, y dos glicoproteínas virales: la glicoproteína de superficie gp120 y la glicoproteína transmembranal gp41. La envuelta recubre la proteína de la matriz (p17) y el núcleo viral (*core*) formado por la proteína de la cápside (p24). En el interior del core se encuentran dos moléculas idénticas de ARN de cadena sencilla, las proteínas p6 y p7 de la nucleocápside, así como las enzimas retrotranscriptasa (RT), integrasa y proteasa.

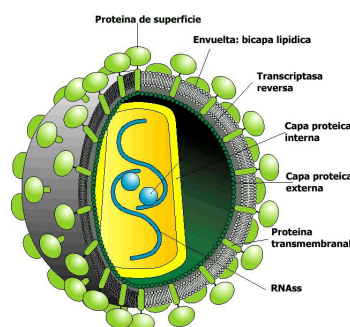


Figura 1.- Estructura del VIH-1

1.2.1.- Características del genoma viral

El genoma del VIH-1 está formado por una doble hebra idéntica de ARN de polaridad positiva de 9,8 kilobases de longitud. Los genes que codifican las proteínas virales se dividen en genes estructurales y reguladores. Los genes estructurales son: el

gen *env*, que codifica las glicoproteínas de la envuelta, el gen *gag*, que codifica las proteínas de la matriz y la proteína p24 de la cápside, y el gen *pol*, que codifica las enzimas responsables de la transcripción inversa, la integración y el procesamiento de los precursores proteicos. Por otro lado los genes reguladores participan en la regulación de la expresión génica, y son: *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, y *vpu* (Greene, 1991). En la tabla 1 se detallan las funciones de las proteínas codificadas por los distintos genes del VIH-1.

Tabla 1.- Genes del VIH-1 y funciones de las proteínas que codifican:

Genes	Proteínas	Funciones
Genes estructurales	<i>env</i>	gp160 Poli-Proteína precursora
		gp120 Interacción con los receptores celulares
		gp41 Fusión de membrana celular y viral
	<i>gag</i>	p55 Poli-Proteína precursora
		p24 Proteína de la cápside
		p17 Proteína de la matriz
		p7 Proteína de la nucleocápside, facilita la transcripción inversa
		p6 Proteína de la nucleocápside, participa en la encapsidación
	<i>pol</i>	Retrotranscriptasa Retrotranscripción del genoma viral Actividad ARNasa H
		Integrasa Integración del genoma retrotranscrito
		Proteasa Procesamiento de las proteínas precursoras Gag-Pol y Gag
Genes reguladores	<i>tat</i>	Tat Transactivador Elongación del ARNm
	<i>rev</i>	Rev Regulación del transporte del ARNm del núcleo al citoplasma Procesamiento del ARNm
	<i>nef</i>	Nef Regulación negativa de CD4 y MHC de clase I Aumento de la infectividad (asociada a un incremento de la retrotranscripción) Inducción de apoptosis en linfocitos T citotóxicos
	<i>vif</i>	Vif Incremento de la infectividad viral Induce la degradación de APOBEC, enzima celular con actividad antiviral
	<i>vpr</i>	Vpr Transporte del complejo de preintegración Transactivador viral Detiene el ciclo celular en la fase G2
	<i>vpu</i>	Vpu Aumenta la liberación de viriones Degradación de CD4 en el retículo endoplásmico

En su forma de ADN completamente retrotranscrito (Greene, 1991), el genoma viral está limitado por unas secuencias repetitivas largas (LTR) o promotores génicos, que facilitan su integración en el genoma de la célula hospedadora y en los que se localizan elementos reguladores de la transcripción viral (Fig. 2).

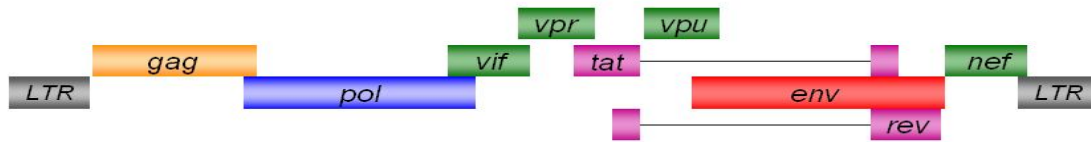


Figura 2.- Genoma del VIH-1

1.3.- Ciclo biológico del VIH-1

El ciclo biológico del VIH-1 puede dividirse en una etapa temprana y una etapa tardía (Figura 3). La fase temprana comienza con la unión de la partícula viral a la superficie celular, su fusión e internalización. A continuación, se produce la decapsidación y liberación del ARN viral en el citosol. Dicho ARN se retrotranscribe en una doble hebra de ADN que se asocia con diversas proteínas para formar el complejo de preintegración (Piller et al., 2003). Este complejo introduce el genoma viral a través de los poros de la membrana nuclear sin dañarla y a continuación, el ADN viral se integra en el genoma de la célula huésped. Después de la integración, el VIH-1 puede permanecer en un estado de latencia post-integración, cuando la célula permanece en reposo, replicarse a bajo nivel o replicarse activamente, después de producirse la activación celular, iniciándose así la fase tardía de su ciclo biológico (Williams & Greene, 2007). En esta fase, tiene lugar la transcripción del ADN integrado, el transporte al citosol y procesamiento del ARN mensajero (ARNm) y la traducción de las proteínas virales. El ciclo finaliza con el proceso de morfogénesis y la liberación de los nuevos viriones (Wang et al., 2000).

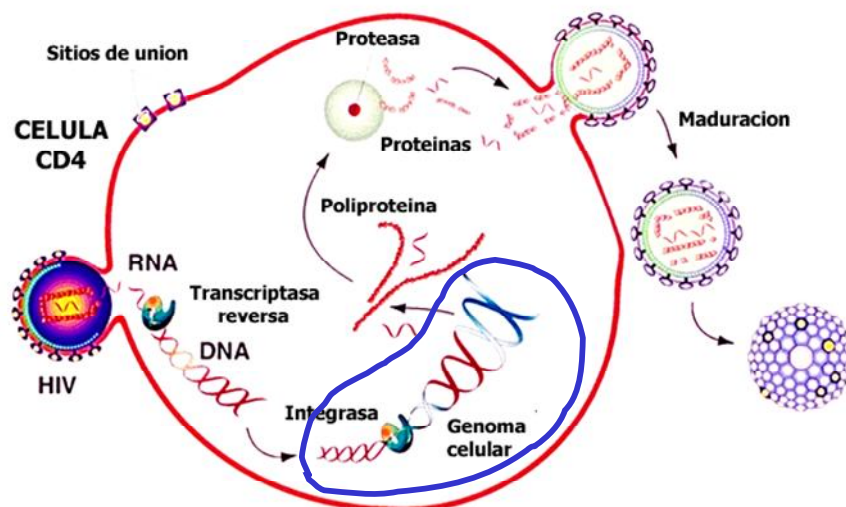


Figura 3.- Ciclo biológico del VIH-1

1.4.- Replicación del VIH-1

La iniciación de la transcripción supone el comienzo de la síntesis del ARN mensajero del VIH-1 a partir del ADN proviral integrado en el genoma celular. El paso de latencia a activación transcripcional no depende exclusivamente de las proteínas virales, sino también de factores transactivadores celulares que interaccionan con secuencias reguladoras localizadas en el LTR viral (Fig. 4). Funcionalmente podemos definir diferentes regiones reguladoras en el LTR. La región *enhancer* contiene una serie de elementos de unión de la proteína activadora 1 (AP-1) (Franza et al., 1988), del factor nuclear de células T activadas (NF-AT) (Romanchikova et al., 2003) y del factor nuclear κ B (NF- κ B) (Nabel & Baltimore, 1987). Se ha demostrado que el elemento esencial en la regulación de la inducción del LTR, especialmente en el curso de los procesos de activación celular, es el factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Alcamí et al., 1995; Duh et al., 1989). En la región promotora básica se encuentran tres consensos para el factor SP1 y una secuencia TATA a las que se asocia el complejo transcripcional primario o complejo de pre-iniciación, que dirige la transcripción mediada por la ARN-polimerasa II. Por último, la proteína viral Tat regula la expresión del LTR del VIH-1 al permitir una elongación completa de los transcritos virales, mediante la unión de la proteína Tat a la región TAR (elemento de respuesta a la transactivación), una estructura de ARN presente en el extremo 5' los ARN virales nacientes (Liang et al., 2005).

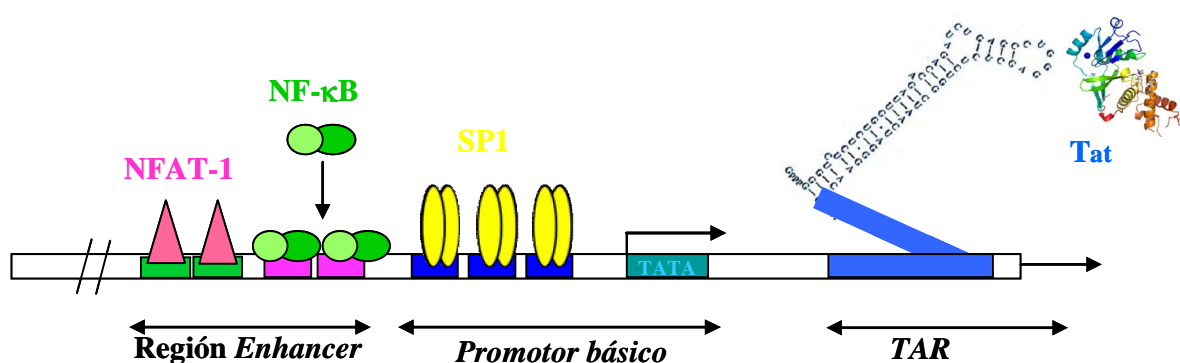


Figura 4.- LTR del VIH-1

1. 5.- Latencia y reactivación viral

La latencia viral es un estado reversible de infección persistente en que el virus permanece quiescente dentro de las células infectadas. Estas células constituyen un reservorio viral ya que no son detectables por el sistema inmune y para la terapia antirretroviral y, consecuentemente persisten en enfermos en tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) (Chun et al., 1997; Finzi et al., 1997). Estos virus latentes pueden reactivarse y producir grandes cantidades de partículas virales (Chun et al., 1997; Wong et al., 1997). La existencia de reservorios virales tiene una gran importancia clínica, pues es el principal factor que impide la completa erradicación del virus (Zamborlini et al., 2007). Esta latencia celular es diferente de la latencia clínica, que se refiere al hecho de que los síntomas de la infección del VIH-1 no se manifiestan como SIDA hasta después de muchos años (Lassen et al., 2004).

La latencia celular del VIH-1 puede producirse antes o después de la integración del virus en el genoma. La latencia pre-integración es de corta duración y no tiene gran significación clínica ya que este ADN proviral tiene una vida media corta (Zack et al., 1990). En las células T CD₄⁺ *naïve* no activadas la infección por VIH-1 es bloqueada porque no hay niveles suficientes de dNTPs y el genoma viral es degradado (Stevenson et al., 1990; Zack et al., 1990). Sin embargo la retrotranscripción viral, aunque a baja velocidad, también ocurre en las células no activadas (Hermankova et al., 2003). La mayoría del ADN complementario (ADNc) permanece en el citoplasma como un provirus ya que los bajos niveles de ATP impiden su translocación nuclear.

Se ha propuesto que la latencia podría establecerse mediante la integración de un provirus en una región genómica que es inaccesible a la maquinaria transcripcional (Jordan et al., 2001) bien por la alta densidad de la cromatina en esa zona (Festenstein et al., 2003) o bien por la deacetilación constitutiva de las histonas, que produce cambios estructurales en la cromatina (Van Lint et al., 1996). Otro mecanismo implicado es el estado de metilación del ADN, puesto que las secuencias metiladas incrementan el reclutamiento de deacetilasas de histonas, interfiriendo así en la replicación viral (Bednarik et al., 1990; Schulze-Forster et al., 1990).

La activación transcripcional del VIH-1 y la producción de una progenie viral infecciosa a partir del estado de latencia depende de la activación de las células T (Chun et al., 1997; Douek et al., 2002; Virelizier, 1990), así como del sitio de integración del

genoma viral en el cromosoma celular. De hecho, estudios de infecciones *in vitro* sugieren que en las células T CD₄⁺ el VIH-1 se integra preferentemente en genes activos (Jordan et al., 2001).

Sin embargo, se ha detectado producción viral a partir de linfocitos CD₄⁺ no activados en órganos linfoides (Zhang et al., 1999). Por ello se ha propuesto que los reservorios celulares latentes, a pesar de no estar activados, permiten una replicación del virus a bajo nivel que es responsable del mantenimiento permanente de la infección en el organismo (Eckstein et al., 2001; Frenkel et al., 2003; Pomerantz, 1999; Tobin et al., 2005).

1.6.- Activación del sistema inmune en la infección por VIH-1

Desde el punto de vista inmunológico la principal característica de la infección por el VIH-1 es la eliminación masiva de las células T CD₄⁺ de las mucosas y el declive progresivo del número de células T CD₄⁺ en sangre periférica (Appay & Sauce, 2008; Guadalupe et al., 2003; Pantaleo et al., 1993). Sin embargo, también se ha puesto de manifiesto la asociación entre la activación inmune y la infección por VIH-1. De hecho, los niveles de activación de las células T predicen más rápidamente la progresión de la enfermedad en pacientes no tratados, independientemente de los niveles plasmáticos de carga viral (Betts et al., 2001; Brenchley et al., 2005).

La causa de esta activación inmune implica distintos mecanismos. En primer lugar, el propio VIH-1 activa una respuesta antigénica frente a sí mismo (Betts et al., 2001; Douek et al., 2002), como ocurre ante cualquier otro patógeno. Sin embargo, este fenómeno no tiene alcance suficiente como para ser el único causante de la activación inmunológica observada en la infección por el VIH-1. Aunque aún no se ha determinado su impacto, diversos estudios *in vitro* apuntan que las proteínas del VIH-1 gp-120 (Lee et al., 2003; Rieckmann et al., 1991) y Nef (Simmons et al., 2001; Swinger et al., 1999) pueden inducir directamente activación de linfocitos y macrófagos, así como la producción de quimiocinas y citoquinas proinflamatorias. Además, la proteína reguladora Tat y la envuelta viral simulan características de las quimiocinas, lo que promueve el reclutamiento local de macrófagos y linfocitos que expresan receptores de quimiocinas y se facilita así no sólo la infección sino también la activación celular (Albini et al., 1998 a y b; Basmaciogullari et al., 2002; Lin et al., 2003). Por otro lado,

el sistema inmune tiene que enfrentarse a patógenos persistentes tales como, por ejemplo, el citomegalovirus (CMV) o el virus de Epstein-Barr. Durante la infección por VIH-1, la pérdida sustancial de células T CD_4^+ produce un deficiente control inmunológico de estos virus persistentes y, por tanto, se favorece su reactivación y replicación (Doisne et al., 2004). Asimismo, la co-infección del VIH-1 con parásitos como *Plasmodium* o con bacterias del género *Mycobacterium* también aumenta la activación de las células T (Báfica et al., 2004; Renia & Potter, 2006).

Por último, la infección por VIH-1 está asociada con un incremento significativo de los niveles de lipopolisacárido (LPS) en plasma, un indicador de la translocación bacteriana que a su vez correlaciona directamente con la activación inmunológica (Brenchley et al., 2006). En general, la translocación de productos bacterianos promueve una activación intensa del sistema inmune innato. Como consecuencia, aumentan los niveles de citoquinas proinflamatorias y se activa NF- κ B (Bonizzi & Karin, 2004), incrementándose la producción de nuevos viriones.

2.- LA PROTEÍNA Tat DEL VIH-1

2.1.- Generalidades

Tat es una proteína reguladora del VIH-1 imprescindible para la replicación viral ya que la delección del gen *tat* origina virus defectivos incapaces de replicarse en linfocitos (Karn, 1999).

Tat está codificada por dos exones separados y según su procesamiento post-transcripcional mediante el proceso de emplame o *splicing* del ARNm se han descrito dos isoformas de la proteína Tat, de 86 o 101 aminoácidos (Gatignol & Jeang, 2000). El primer exón se localiza en la región central del genoma viral, y el segundo exón solapa con el gen *env*. La mayoría de las variedades de VIH-1 expresan la isoforma de 101 aminoácidos. Esta proteína consta al menos de cinco dominios o regiones funcionales diferentes (Figura 5) (Pugliese et al., 2005). Destaca el dominio rico en cisteínas, que es responsable de la formación de puentes disulfuro intracelulares (Koken et al., 1994), así como la región de aminoácidos básicos donde se localizan los sitios de unión a la región TAR del ARN (Chang & Jeang, 1992) y las señales de localización nuclear (Hauber et

al., 1989). El dominio mínimo de activación lo forman los dominios 2 y 3 junto con la región N-terminal (Carrol et al. 1991; Derse et al., 1991). En el exón 2 se incluyen una secuencia Arg-Gly-Asp altamente conservada (RGD) que se une a las integrinas de membrana (Barillari et al., 1993; Brake et al., 1990).

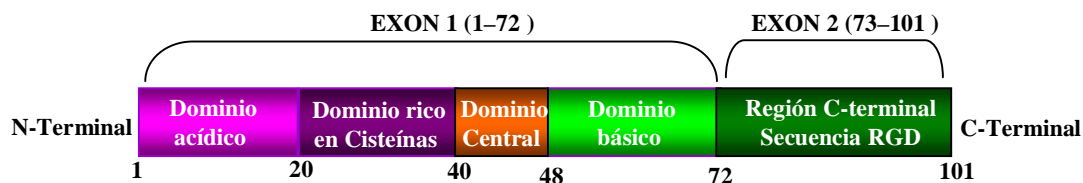


Figura 5.- Dominios de la proteína Tat del VIH-1 (isoforma 101 aminoácidos)

Tat se acumula en el núcleo de las células infectadas por VIH-1, pero actúa como un factor exógeno pleiotrópico gracias a su capacidad de solubilizarse en el medio extracelular (Tat extracelular) y de ser internalizado en las células diana por endocitosis, adsorptiva o mediada por receptores (Barillari et al., 1993; Ensoli et al., 1993; Magnuson et al., 1995). Tat extracelular, una vez internalizada por la célula, migra hacia el núcleo e induce los mismos efectos que en las células activamente infectadas por el VIH-1 (Mann & Frankel, 1991).

2.2.- Funciones de la proteína Tat del VIH-1

Múltiples estudios han demostrado que Tat juega un papel esencial no sólo en la replicación del VIH-1 sino también en la propia patogénesis de la infección viral. Las acciones de Tat afectan tanto a las células infectadas por VIH-1 como a las no infectadas, y dentro de éstas, afecta tanto las adyacentes como a las más alejadas. En concreto, Tat modula la expresión de genes celulares e induce vías de transducción de señales y la activación de factores de transcripción (Gibellini, et al., 2005). Los efectos multifactoriales de Tat dependen del tipo celular afectado, del grado de maduración celular y de la localización intra o extracelular de Tat (Peruzzi et al., 2006).

En este contexto las líneas celulares establemente transfectadas con la proteína Tat del VIH-1 son una herramienta muy útil para estudiar las modificaciones celulares inducidas por la expresión constitutiva de Tat.

2.2.1.- Papel de Tat en la transcripción del VIH-1

La proteína transactivadora Tat del VIH-1 es el regulador más importante de la expresión de los genes virales así como de la replicación del virus (Jeang et al., 1999; Muesing et al., 1987). De hecho, la transcripción del VIH-1 se caracteriza por una fase temprana independiente de Tat y otra más tardía dependiente de Tat (Brady & Kashanchi, 2005). La replicación del VIH-1 se incrementa más de cien veces en presencia de Tat.

Tat actúa como un factor de transcripción inusual porque en lugar de unirse al ADN para potenciar la transactivación se une un ARN altamente estructurado que se conoce como TAR (Berkhout et al., 1989; Calnan et al., 1991; Selby et al., 1989). El elemento TAR está presente en el extremo 5' de todos los transcritos virales (+1 a +59), independientemente de que se hayan sometido o no a modificaciones post-transcripcionales mediante el proceso de *splicing* o de su localización subcelular y, además de Tat también une proteínas celulares y complejos de ribonucleoproteínas (Brigati et al., 2003; Dandekar et al., 2004). La unión de Tat al elemento TAR permite una elongación transcripcional eficiente de los transcritos virales (Bannwarth & Gagnon, 2005) al promover la formación de un complejo de elongación transcripcional activo mediante el reclutamiento, entre otros, del factor P-TEFb (factor de elongación transcripcional positivo b), que a su vez es un complejo formado por la ciclina T1 y la quinasa 9 dependiente de ciclina (CDK9). La subunidad ciclina T1 interacciona con Tat y promueve su unión al elemento TAR (Wei et al., 1998). La subunidad CDK9 hiperfosforila el dominio C-terminal de la ARN polimerasa II, enzima encargada de la elongación transcripcional, y así se incrementa su capacidad de procesamiento (Fujinaga et al., 1998; Garber et al., 1998; Parada et al., 1996; Zhou et al., 2000). En ausencia de Tat, la activación de la transcripción mediada por el LTR del VIH-1 genera transcritos virales cortos y, por tanto incompletos, debido al estado de hipofosforilación de la ARN polimerasa II. Por otro lado, para que la interacción entre el elemento TAR y el complejo Tat/P-TEFb tenga elevada afinidad es necesaria la autofosforilación de la CDK9 (Garber et al., 2000; Zhou et al., 2000).

En la transactivación del LTR del VIH-1, Tat también recluta acetiltransferasas de histonas tales como p300, p300/CBP y PCAF (factor asociado a p300/CBP) (Benkirane et al., 1998; Hottiger & Nabel, 1998; Marzio et al., 1998). En primer lugar,

p300/CBP acetila a Tat en la lisina 50 (Tat-ac-50) formándose un complejo terciario p300/CBP/Tat-ac-50/P-TEFb que se asocia con el complejo de iniciación de la transcripción para formar en conjunto un complejo de elongación eficiente (Bannwarth & Gatignol, 2005; Ott et al., 1999). Este último complejo es capaz de reclutar a PCAF, que a su vez acetila a Tat en la lisina 28 (Tat-ac-28), incrementándose la afinidad de unión del complejo Tat-ac-28/P-TEFb al elemento TAR (Brès et al., 2002; Kiernan et al., 1999). La figura 6 muestra un resumen de los factores reclutados por Tat para mediar la elongación eficiente del ARNm del VIH-1.

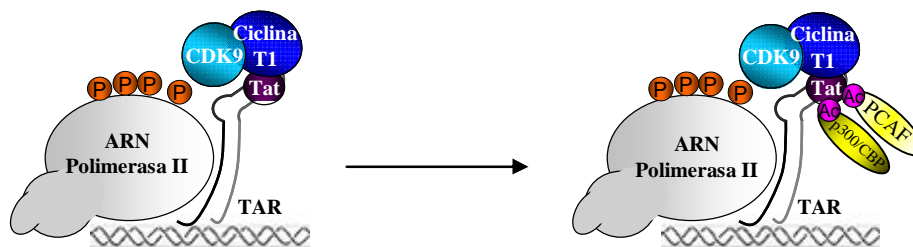


Figura 6.- Factores reclutados en la elongación de transcritos del VIH-1 mediada por Tat

Recientemente, se ha retomado la idea de que Tat también tiene un papel crítico en el inicio de la transcripción (Brady & Fatah, 2005), bien mediante la interacción con el factor de transcripción TBP (proteína de unión a TATA) y promoviendo tanto la iniciación como la elongación (Raha et al., 2005), o bien participando en el ensamblaje del complejo transcripcional en la fase de pre-iniciación (Jeang & Berkhout, 1992; Jeang et al., 1993 a). El reclutamiento mediado por Tat de las acetiltransferasas de histonas p300/CBP y PCAF promueve remodelaciones de la estructura de la cromatina que facilitan la activación de la transcripción del VIH-1 (Benkirane et al., 1998; Hottiger & Nabel, 1998). Por último, Tat interviene en el inicio de la transcripción mediante la activación de los factores SP1 y NF- κ B que son esenciales para promover la expresión de genes del VIH-1 (Chun et al., 1998; Liu et al., 1991).

Diversas investigaciones han mostrado evidencias de que Tat también puede transactivar la expresión de genes del VIH-1 en ausencia del elemento TAR (Berkhout et al., 1990; Harrich et al., 1990; Niikura et al., 1996;). Se han implicado distintos mecanismos como la potenciación de la retrotranscripción (Harrich et al., 1997) o la interacción directa con el LTR del VIH-1 a través de los sitios de unión de los factores SP1 (Jeang et al., 1993 b), NF-AT (Kinoshita et al., 1999) y NF- κ B (Dandekar et al., 2004).

2.2.2.- Efecto de Tat sobre la regulación de la expresión de genes celulares

Tat modula la expresión de numerosos genes celulares y de esta manera modifica el ambiente celular, haciéndolo más propicio para la replicación viral (Brigati et al., 2003). En concreto, Tat induce la expresión de genes que codifican interleucinas, quimiocinas y sus receptores como por ejemplo IL-8 (Ott et al., 1998), IL-10 (Bennasser & Bahraoui, 2002), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Bennasser et al., 2002), factor de crecimiento tumoral β (TGF- β) (Barreto-de-Souza et al., 2008), interferon α (IFN- α) (Pugliese et al., 2000) y CXCR4 (Gibellini et al., 2003). La expresión de la molécula de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) (Howcroft et al., 1993) y de la manganasa superóxido dismutasa (MnSOD) es reprimida por la expresión de Tat (Flores et al., 1993).

2.2.3.- Efecto de Tat sobre la activación de NF- κ B

Tat también regula la activación de factores de transcripción involucrados en la expresión de los genes del VIH-1, tales como NF- κ B (Dandekar et al., 2008; Demarchi et al., 1996 y 1999), Sp1 (Chun et al., 1998), NF-AT y AP-1 (Hidalgo-Estévez et al., 2006; Macián & Rao A, 1999).

La máxima activación del LTR del VIH-1 requiere la acción concertada de Tat y de NF- κ B (Alcamí et al., 1995; Biswas et al., 1992, Liu et al., 1992). De hecho, la transactivación del LTR del VIH-1 mediada por Tat se bloquea al sobreexpresar inhibidores de NF- κ B tales como I κ B α e I κ B β , o I κ B α mutado que se comporta como un superrepresor al ser resistente a la degradación en el proteasoma (Beauparlant et al., 1996; Harhaj et al., 1996).

Por otro lado, la propia proteína Tat es capaz de inducir la degradación de I κ B α y permitir así la translocación nuclear de heterodímeros activos de NF- κ B (Cota-Gómez, 2002; Demarchi et al., 1996; Westendorp et al., 1995 b). La base molecular de la activación de NF- κ B mediada por Tat podría ser la activación de NIK (quinasa inducida por NF- κ B), que a su vez activa a las IKK (complejo de las quinasas de I κ B) y, por tanto, potencia la degradación de I κ B α (Li et al., 2001). Demarchi et al. (1999) proponen que Tat activa la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR), con la consecuente fosforilación de I κ B α , entre otros factores celulares.

Más recientemente se ha demostrado que I κ B α regula negativamente la replicación del VIH-1 no sólo mediante su unión a NF- κ B sino también mediante su interacción directa con Tat, que resulta en la exportación nuclear de esta proteína transactivadora y su retención en el citosol (Puca et al., 2007).

Debido a que en primer lugar Tat recluta la enzima acetiltransferasa p300/CBP al complejo de elongación transcripcional (Benkirane et al., 1998, Hottiger & Nabel, 1998) y en segundo lugar que la subunidad p65/RelA de NF- κ B es sustrato de esta enzima (Zhong et al., 2000), p300/CBP podría acetilar p65/RelA potenciando así la capacidad transcripcional de NF- κ B.

2.2.4.- Interacción de Tat con receptores celulares

Tat extracelular media algunos efectos patogénicos, por ejemplo, la angiogénesis, mediante la interacción con receptores localizados en la superficie de distintos tipos de células diana. Entre otros se incluyen el receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (Albini et al., 1996), receptores de quimiocinas como CXCR4 (Albini et al., 1998) e integrinas como $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_5\beta_1$ (Barillari et al., 1999; Urbinati et al., 2005).

2.2.5.- Papel de Tat en la apoptosis celular

Se han propuesto distintos mecanismos para explicar el descenso de células T CD4⁺ en la infección del VIH-1 *in vivo*, como por ejemplo que el propio virus eliminaba a la célula infectada al iniciar los procesos de apoptosis o muerte celular programada (Ho et al., 1995; Wei et al., 1995). Diferentes datos sugieren que el VIH-1 ha desarrollado una estrategia que le permite proteger de apoptosis a las células infectadas e inducirla en las no infectadas (Nardelli et al., 1995).

En particular, la proteína Tat del VIH-1 ejerce un papel dual en la regulación de la apoptosis en distintos tipos celulares entre los que se incluyen las células T (McCloskey et al., 1997; Pocernich et al., 2005). Concretamente, las células infectadas por el VIH-1 que expresan Tat intracelular parecen mostrar resistencia a la apoptosis, mientras que las células no infectadas por el virus pero que han internalizado Tat extracelular inician rápidamente los procesos de muerte celular programada. McCloskey

et al. (1997) demostraron que en células T, la adición de Tat exógeno potenciaba la apoptosis mediada por activación del receptor Fas o por TNF α , mientras que su expresión endógena era protectora. Más recientemente se ha demostrado que la expresión constitutiva de Tat en células Jurkat protege de apoptosis mediada por TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF) (Gibellini et al., 2001). Del mismo modo, la proteína Tat liberada de astrocitos infectados induce muerte celular en las neuronas adyacentes, que no están infectadas, mientras que los astrocitos infectados se muestran resistentes a la apoptosis (Pocernich et al., 2005).

2.2.6.- Relación de Tat con los componentes del citoesqueleto

El citoesqueleto participa en procesos fisiológicos entre los que se incluyen la migración celular y la apoptosis (Papakonstanti & Stournaras, 2008). La migración se lleva a cabo gracias a la plasticidad del citoesqueleto de actina, que controla tanto la orientación y la dirección del movimiento como la adquisición de la morfología polarizada característica (Drubin & Nelson, 1996). La quimiocina CXCL12 o SDF-1 α (factor 1 α derivado de células estromales), tras la interacción con el receptor CXCR4, regula los procesos de migración linfocitaria (Klein & Rubin, 2004). Asimismo, CXCR4 es un co-receptor para la entrada del VIH en linfocitos T (Berger et al., 1998) y puede interactuar directamente con Tat (Albini et al., 1998).

Se han identificado diferentes dominios de Tat implicados en la unión de Tat a los microtúbulos, lo que sugiere que Tat debe de formar parte de un complejo multi-molecular asociado con la red de microtúbulos (Giacca, 2005). En el citoplasma de células Jurkat, la proteína Tat interacciona directamente con los dímeros α/β -tubulina y con los microtúbulos polimerizados, alterando la dinámica de polarización-despolarización (Campbell et al., 2004; Chen et al., 2002; de Mareuil et al., 2005). Esta interacción aumenta la liberación de la proteína pro-apoptótica Bim y del citocromo c (Chen et al., 2002; Maureil et al. 2005) pero no altera ni la progresión del ciclo celular ni la organización general de la red de microtúbulos (Maureil et al. 2005). Las reorganizaciones del citoesqueleto de actina intervienen en los cambios morfológicos observados durante la apoptosis (Mills et al., 1998). En células endoteliales, Tat induce la reorganización del citoesqueleto de actina, mediante la activación de la quinasa 1 activada por p-21 y de la enzima NADPH oxidasa (Wu et al., 2004). La reorganización

del citoesqueleto de actina conlleva cambios en la ondulación de la membrana, retracción de las zonas periféricas y desensamblaje del citoesqueleto, procesos que conjuntamente intervienen en la apoptosis

3.- FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NF- κ B

3.1.- Generalidades

Las proteínas de la familia NF κ B son factores de transcripción inducibles implicados en la regulación de la expresión de un amplio número de genes que controlan la respuesta inmune, tanto innata como adaptativa, así como genes que intervienen en proliferación celular y apoptosis (Ghosh & Karin, 2002; Li & Verma, 2002).

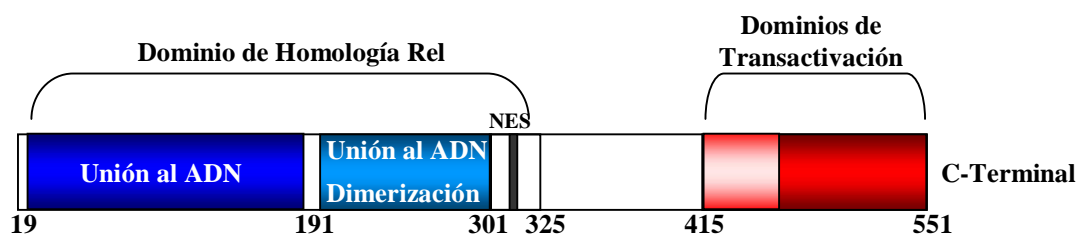


Figura 7.- Dominios de la proteína p65/RelA. NES: secuencia de exportación nuclear.

Los miembros de la familia NF- κ B incluyen las proteínas p65/RelA, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105), NF- κ B2 (p52 y su precursor p100), c-Rel y RelB. Estas proteínas comparten en la región N-terminal un dominio de homología Rel de 300 aminoácidos o región RHD, responsable de la dimerización, de la translocación nuclear y de la unión a secuencias consenso del ADN (Liou & Baltimore, 1993; Verma et al., 1995) (Fig. 7). Las proteínas c-Rel, RelB y p65/RelA también poseen un dominio de transactivación en la región carboxilo terminal, que activa potentemente la transcripción mediante la unión a los sitios consenso de NF- κ B que se localizan en los promotores de los genes cuya expresión regula. El resto de proteínas carecen del dominio de transactivación, aunque son capaces de unirse a las secuencias de unión de NF- κ B que hay en el ADN y, por tanto, pueden funcionar como represores transcripcionales. En las células de mamíferos, NF- κ B está compuesto por homodímeros o heterodímeros de

distintos miembros de la familia. En los linfocitos la forma activa más abundante es el heterodímero formado por una subunidad de p50 unida a una subunidad de p65 a una subunidad de c-Rel (Finco & Balwin, 1995).

Las proteínas NF- κ B se encuentran en el citosol en forma inactiva asociadas a sus inhibidores, las proteínas I κ B. Los miembros más importantes de la familia de proteínas I κ B son I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ y Bcl-3, siendo I κ B α el inhibidor principal en linfocitos (Cheng et al., 1998). En la región central la proteína I κ B α contiene seis repeticiones de anquirina, secuencias de 33 aminoácidos que median las interacciones con NF- κ B, y una secuencia de localización nuclear (NLS). I κ B α contiene dos señales de exportación nuclear (NES), una en el extremo carboxilo y otra en el amino (Puca et al., 2007). El extremo amino se fosforila en respuesta a estímulos de activación celular, marcándose así para su degradación en el proteasoma.

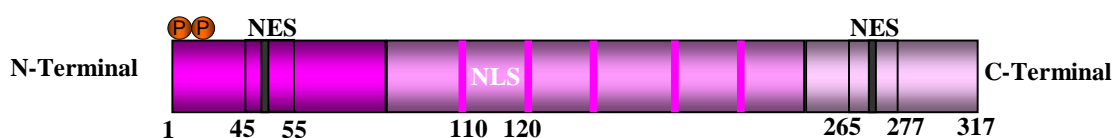


Figura 8.- Dominios de la proteína I κ B α .

3.2.- Regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B

Existen dos vías de señalización principales que conducen a la translocación de los dímeros de NF- κ B del citoplasma al núcleo (Bonizzi et al., 2004). Las citoquinas proinflamatorias, que actúan a través de la familia de receptores de TNF, y las “estructuras moleculares asociadas a patógenos” (PAMP) que actúan a través de la familia de receptores de tipo Toll (TLR).

En células no activadas de mamíferos, las proteínas I κ B α se unen de modo no covalente a la región RHD de las proteínas NF- κ B, enmascarando las señales de localización nuclear e impidiendo, por tanto, su translocación al núcleo (Beg et al., 1992). La activación celular mediante diversos estímulos tales como citoquinas, factores de crecimiento, ésteres de forbol, radiación ultravioleta, etc. (Baeuerle, 1991) provoca la fosforilación de I κ B α a través del complejo de IKK, y su posterior poliubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S (Alkalay et al., 1995; Chen et al., 1995). La

estructura más común del complejo IKK está formada por dos subunidades catalíticas (IKK- α e IKK- β) que se unen a la subunidad reguladora IKK- γ . Como consecuencia de la degradación de I κ B α , NF- κ B es liberado al citoplasma y se puede translocar al núcleo, donde se une a secuencias consenso - κ B en los promotores de los genes cuya expresión regula (Ghosh y Karin, 2002; Li y Verma, 2002), siendo I κ B α uno de los primeros genes expresados. Además, I κ B α posee secuencias de localización nuclear y de exportación nuclear por lo que puede entrar y salir del núcleo independientemente de su unión a NF- κ B. De este modo, I κ B α de nueva síntesis accede al núcleo y se une a NF- κ B, lo desplaza de su unión al ADN y lo devuelve en estado inactivo al citoplasma, ejerciendo así una función de freno transcripcional de NF- κ B (Arenzana-Seisdedos et al., 1995 y 1997).

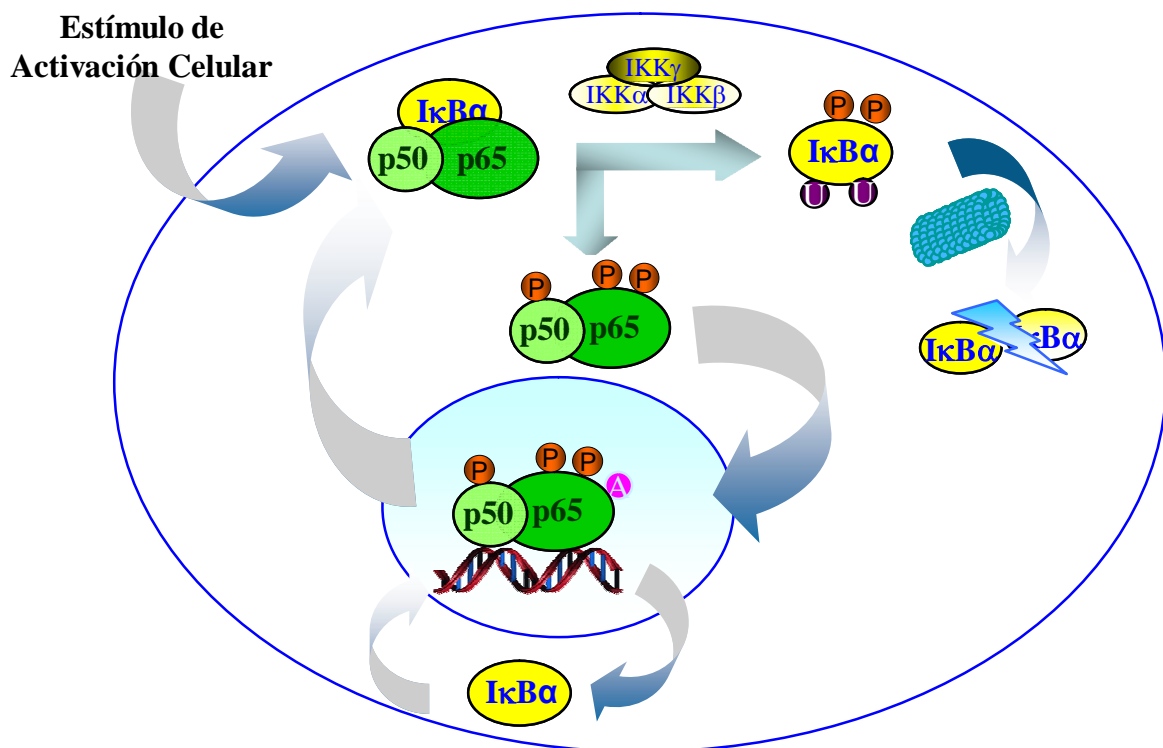


Figura 9.- Esquema de la regulación de la actividad transcripcional de NF- κ B

El estudio del tráfico núcleo-citosólico de estas proteínas puede estudiarse más en profundidad utilizando un inhibidor específico de la exportación nuclear de proteínas, como es la leptomicina B (LMB). Este compuesto es un potente antifúngico producido por *Streptomyces spp* que es capaz de bloquear la salida del núcleo de proteínas que contienen secuencias de exportación nuclear ricas en leucina, específicamente reconocidas por la exportina-1 (CRM1) (Ullman et al., 1997), como es el caso de p65/RelA, p50 e IκBα. El mecanismo de inhibición implica la unión covalente de LMB a un residuo de cisteína de la región central conservada de la CRM1 (Kudo et al., 1999). De esta manera, se bloquea la unión de la CRM1 a las proteínas que contienen NES ricas en leucina pero no se afecta la exportación nuclear de ARNm (Moore & Rosbash, 2001).

Tradicionalmente se ha considerado que la actividad de NF-κB viene regulada por la degradación de IκBα inducida por la activación celular anteriormente descrita. Sin embargo, la actividad de las proteínas NFκB también puede ser regulada mediante modificaciones postraduccionales tales como fosforilaciones y acetilaciones. Así, la fosforilación de las Ser⁵²⁹ y Ser⁵³⁶ de p65/RelA por el complejo de las IKK aumenta su actividad transcripcional (Sakurai et al., 1999). Además, la fosforilación de la subunidad p50, mediada por la fosfatidilinositol-3-quinasa en respuesta a IL-1, aumenta la capacidad de unión al ADN del complejo NF-κB (Koul et al., 2001). Por otro lado, los factores de transcripción reclutan acetiltransferasas y deacetilasas de histonas en los sitios de unión al ADN que controlan la estructura de la cromatina mediante la modificación del estado de acetilación de las histonas. Éste afecta al plegamiento y la función de la cromatina y modula la accesibilidad de la maquinaria transcripcional al ADN (Eberharther & Becker, 2002). Zhong et al. (2002) describieron que cuando p65/RelA está fosforilado se asocia con el complejo p300/CBP, con actividad acetiltransferasa, y se incrementa la expresión de los genes dependientes de NF-κB. Por otro lado, p65/RelA acetilado interacciona débilmente con IκBα facilitando así su unión al ADN y, por consiguiente, la actividad transcripcional (Chen et al., 2001 a). Por el contrario, cuando la deacetilasa de histonas 3 deacetila p65/RelA aumenta su afección por IκBα, lo cual resulta en la salida de los complejos NF-κB hacia el citoplasma.

4.- FAMILIA DE RECEPTORES TLR

4.1.- Generalidades

Los receptores Toll fueron inicialmente descritos en *Drosophila* como unos receptores esenciales para el establecimiento de la polarización dorso-ventral durante el desarrollo (Hashimoto et al., 1988). Posteriormente, se observó que participaban también en las respuestas inmunes innatas mediadas frente a infecciones fúngicas (Lemaitre et al., 1996). En mamíferos se identificaron receptores homólogos a los receptores Toll y, en consecuencia, se llamaron receptores de tipo Toll (TLR). Hasta el momento se han identificado 10 receptores funcionales de tipo TLR diferentes en humanos (Takeda & Akira, 2004). Estos receptores son sensores primarios que alertan al organismo de la presencia de patógenos mediante el reconocimiento de componentes conservados en virus, bacterias, protozoos y hongos, y no expresados en mamíferos, que en su conjunto se conocen como PAMP (Doyle & O'Neill, 2006; Takeda & Akira, 2004; Takeda et al., 2003;). La tabla 2 resume los PAMP más comunes. Por lo tanto, la expresión de los receptores TLR es crítica en el sistema inmune innato, expresándose en monocitos, células dendríticas y neutrófilos. Los TLR se expresan en un elevado número de tejidos no inmunes que forman parte de la barrera de protección frente a patógenos, entre los que se incluyen la piel (Pivarcsi et al., 2003) y los tractos genitourinario, intestinal y respiratorio (Abreu et al., 2005; Droemann et al., 2003; Fazeli et al., 2005; Ritter et al., 2005).

Tabla 2.- PAMP más comunes y receptores TLR que los reconocen:

Tipo de TLR	Principal Ligando	Referencias
TLR2	Peptidoglicano	Takeuchi et al., 2000; Wang et al., 2003
TLR2/TLR1	Lipopéptidos tipo triacil	Hajjar et al., 2001
TLR2/TLR6	Lipopéptidos tipo diacil	Hajjar et al., 2001
TLR4	Lipopolisacárido	Beutler & Poltorak, 1998; Hoshino et al., 1999
TLR5	Flagelina	Hayashi et al., 2001
TLR7	ARNmc	Wang et al., 2006
TLR3	ARNdc	Kulka et al., 2004
TLR9	CpG	Hemmi et al., 2000

Además del PGN, el receptor TLR2 reconoce gran variedad de PAMP procedentes de bacterias, virus, parásitos, hongos y levaduras, aunque se desconoce porque es tan versátil (Xu et al., 2004).

Los receptores TLR3, TLR7 y TLR9 son intracelulares, el resto se localizan en la membrana celular (Takeda & Akira, 2004). La mayoría de los TLR funcionan como dímeros, y sólo algunos lo hacen en forma de heterodímeros. En concreto, TLR2 heterodimeriza con los receptores TLR1 o TLR6 para la discriminación de los lipopéptidos tipo triacil y diacil bacterianos (Hajjar et al., 2001).

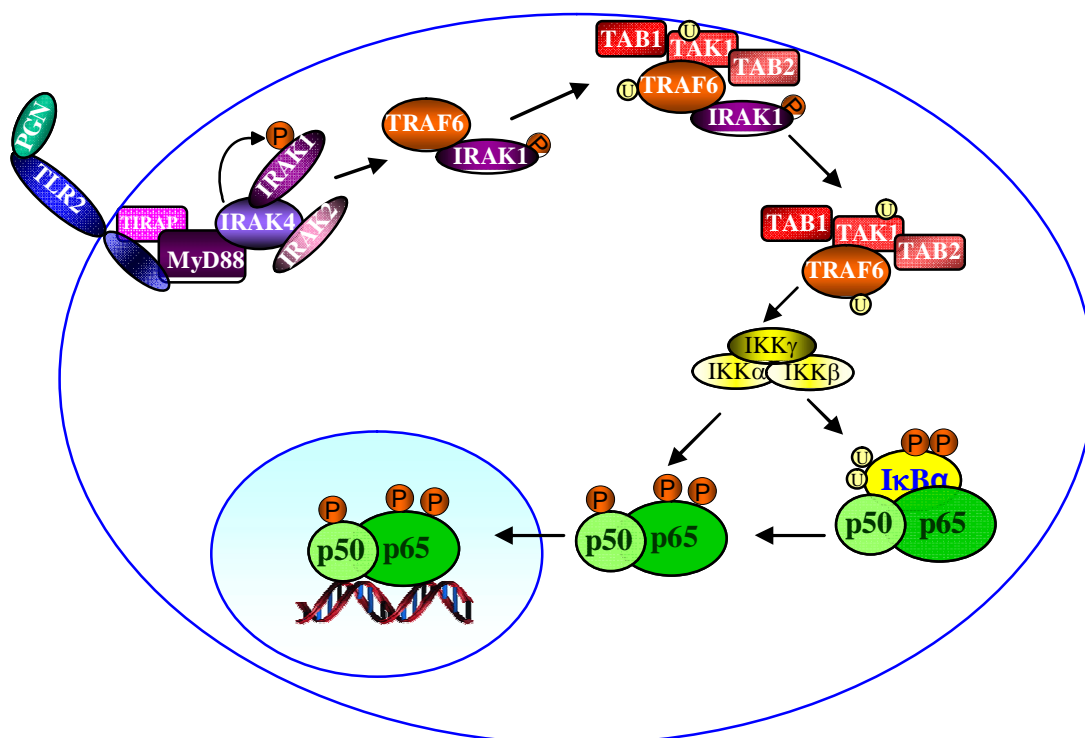


Figura 10.- Activación de NF-κB mediante la activación de receptores TLR a través de la ruta dependiente de MyD88

Estructuralmente, los TLR son receptores de membrana de tipo I formados por un dominio N-terminal extracelular, que contiene las repeticiones ricas en leucinas responsables del reconocimiento específico de los PAMP, un dominio transmembrana y un dominio C-terminal citoplasmático similar al encontrado en el receptor de la IL-1, conocido como dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR) y responsable de la señalización intracelular (Kawai & Akira, 2007; Takeda & Akira, 2004). La señalización intracelular mediada por receptores TLR requiere el reclutamiento de proteínas adaptadoras entre las que MyD88 (gen 88 de la respuesta primaria de diferenciación mieloide) es común a todos los receptores TLR, excepto al TLR3. La proteína TIRAP (proteína adaptadora

que contiene el dominio TIR) es utilizada como adaptador molecular por los receptores TLR3 y 4. Por tanto, se definen dos vías de señalización, dependiente e independiente de MyD88 que, aunque utilizan mediadores intracelulares diferentes, culminan en la activación de NF- κ B (Doyle & O'Neill, 2006; Kawai & Akira, 2007) (Fig. 10).

4.2.- Expresión de receptores TLR en células T

Tradicionalmente se ha considerado que los receptores TLR funcionan como enlace entre los sistemas inmunes innato y adquirido. Las DCs inmaduras, localizadas en los tejidos periféricos, maduran tras la interacción de las moléculas microbianas con los receptores TLR y migran a los ganglios linfoides, donde tras la presentación antigénica inducen la diferenciación de las células T a células de respuesta Th1 o Th2 (Sieling et al., 2003; Thoma-Uszynski et al., 2000; Xu et al., 2004).

Se ha descrito que las células T expresan receptores TLR funcionales en su superficie (Cottalorda et al., 2006; Gelman et al., 2004; Imanishi et al., 2007; Kabelitz, 2007; Komai-Koma et al., 2004), lo que permite que las células T puedan responder directamente a las señales de activación inducidas por la presencia de patógenos. Además, las células T CD₄⁺ *naïve* no expresan niveles detectables de proteínas TLR2 ni TLR4 en humanos (Komai-Koma et al., 2004), ni de proteínas TLR3 y TLR9 en ratones (Gelman et al., 2004). En ambos casos, tras la activación del receptor de la célula T (TCR) se induce una elevada expresión del TLR correspondiente. Por otro lado, el tratamiento de estas células T activadas con ligandos específicos de TLR activa la respuesta tipo Th1 (Komai-Koma et al., 2004) así como la supervivencia celular mediada activación de NF- κ B (Gelman et al., 2004). Sin embargo, estos trabajos son contradictorios dado que Gelman et al. no detectaron la expresión de ARNm de TLR2 y TLR4, mientras el grupo de Komai-Koma sí los detectaron. Estas discrepancias pueden deberse a la utilización de tipos celulares diferentes. La activación de TLR2 en células T CD₈⁺ de ratón reduce el umbral de activación necesario para la activación inducida por antígeno y, en condiciones de co-estimulación, incrementa la proliferación celular y la expresión de CD₂₅. Por lo tanto, en las células T los receptores TLR pueden funcionar como co-receptores que potencian la proliferación, la supervivencia celular y/o la producción de citoquinas en células T activadas a través del TCR. Además, la estimulación de células T con ligandos específicos frente a TLR2, TLR5 y TLR7 induce

la producción de IFN- γ , lo que sugiere que algunos ligandos de TLR podrían estimular las células T no activadas (Caron et al., 2005; Xu et al., 2004).

4.3.- Papel de los receptores TLR en la activación del VIH-1

La activación de los receptores TLR desencadena la activación de NF- κ B, factor esencial en la activación de la replicación del VIH-1. Está descrito que la estimulación de los receptores TLR2, TLR4 o TLR9 inducen tanto la transactivación del LTR como la replicación del VIH-1 en mastocitos latentemente infectados por el virus (Sundstrom et al., 2004), en células de bazo y en la línea celular monocítica THP-1 (Equils et al., 2001), y en células del endotelio vascular (Equils et al., 2003; Sundstrom et al., 2004).

Además, las células T CD $_4^+$, principal reservorio del VIH-1, pueden ser directamente e indirectamente activadas por los ligandos de los receptores TLR, y esta activación juega un papel muy importante en la patogénesis del VIH-1. Fragmentos de ARN ricos en uridina derivados del genoma del VIH-1 interaccionan con el receptor TLR7 en DC y macrófagos, activando directamente la liberación de IFN- α y citoquinas inflamatorias e indirectamente a las células T (Heil et al., 2004; Meier et al., 2007). De hecho, se ha propuesto que los altos niveles plasmáticos de LPS, derivados de la translocación bacteriana, son responsables de la activación inmune sistémica descrita en pacientes infectados por el VIH-1 de manera crónica (Brenchley et al., 2006). Los niveles de activación de las células T CD $_4^+$ son inversamente proporcionales al restablecimiento de los mismos después del TARGA. Por lo tanto, las frecuentes coinfecciones del VIH-1 con otros patógenos diferentes como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani*, *Toxoplasma gondii* o bacterias del género *Mycobacterium* podrían potenciar la activación de las células T y debe considerarse su implicación en la progresión y la severidad del SIDA.

En este trabajo se han estudiado distintos aspectos relacionados con los factores más importantes implicados en el control de la replicación del VIH-1, en concreto el factor de transcripción celular NF- κ B y la proteína viral Tat. Para ello hemos dividido el trabajo en tres objetivos específicos principales. Los dos primeros objetivos se centran en el estudio de la regulación de la replicación del VIH-1 a través del sistema NF κ B/I κ B α en linfocitos T humanos de sangre periférica, tanto en ausencia de activación como mediante la activación del receptor TLR2. El tercer objetivo es el estudio de las alteraciones funcionales inducidas por la expresión constitutiva de la proteína Tat del VIH-1 en linfocitos T, principalmente en el estado basal de activación de NF- κ B, en la estructura y funcionalidad del citoesqueleto y en la resistencia a apoptosis.

Los objetivos específicos planteados en este trabajo son los siguientes:

- 1.- Estudio del tráfico nucleocitosólico de NF- κ B/I κ B α en linfocitos T CD₄⁺ de sangre periférica no activados y su implicación en la replicación del VIH-1.
- 2.- Estudio de la replicación del VIH-1 a través de la estimulación del receptor TLR2 en linfocitos T de sangre periférica.
- 3.- Estudio de las modificaciones celulares inducidas por la expresión constitutiva de la proteína Tat del VIH-1 en células Jurkat.

1.- MATERIALES

1.1- Células

1.1.1.- Células T expandidas con PHA e IL-2 y linfocitos T CD₄⁺ purificados

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de la sangre de donantes sanos. Las células T expandidas con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e IL-2 y los linfocitos T CD₄⁺ altamente purificados se obtuvieron a partir de estas células tal y como se describe en el apartado de métodos.

1.1.2.- Jurkat

Las células Jurkat son una línea de células humanas procedente de una leucemia de linfocitos T CD₄ (Schneider et al., 1977) (American Type Culture Collection, ATCC®, número de catálogo: TIB-152™). Las células Jurkat Tet-Off (BD Biosciences Clontech, Mountain View, CA, USA) y Jurkat-Tat se obtuvieron a partir de estas células utilizando el sistema de control de expresión Tet-Off (BD Biosciences Clontech) tal y como se describe en el apartado de métodos.

1.1.3.- HEK 293T

Las células 293T (American Type Culture Collection, ATCC®, número de catálogo: CRL-11268) son fibroblastos de riñón embrionario humano inmortalizados con adenovirus 5, que poseen el antígeno mayor T del virus simio 40 (SV-40) (Pear et al., 1993).

1.1.4.- MT-2

Se trata de una línea celular derivada de linfocitos T CD₄ transformados con el virus de la leucemia humana de células T de tipo I (Harada et al., 1985) (NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, número de catálogo: 237).

1.2.- Medio de cultivo

Medio completo: RPMI-1640 (BioWhitaker) suplementado con L-glutamina 2 mM (BioWhitaker), con penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (BioWhitaker) y suero bovino fetal al 10% (BioWhitaker).

1.3.- Anticuerpos

La tabla 3 resume los anticuerpos utilizados y las casas comerciales de las que se obtuvieron:

Tabla 3.- Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Casa Comercial
CD ₃ -PE CD ₂ -PE CD ₆₉ -PE CD ₁₉ -PE CD ₄ -PE CxCR4-PE	BD Bioscience
CD ₂₅ -FITC CD ₅₆ -FITC	BD Bioscience
IgG1-PE IgG1-FITC IgG2A-PE	BD Bioscience
IκBα p65/RelA Histona H1	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
IκBα fosforilado en Ser ³²	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
p65/RelA fosforilado Ser ⁵³⁶	Cell Signaling Technology
β-actina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
TLR2	Santa Cruz Biotechnology
Anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas de conejo o de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP)	GE Healthcare (Uppsala, Suecia)
Anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas de conejo o de ratón conjugados con Alexa 488 y Texas-Red	Molecular Probes (Eugene, OR, USA)
Anticuerpo secundario Anti-Conejo-FITC	DakoCytomation (Dinamarca)
CD ₃ (clon UCHT1)	eBioscience (San Diego, USA)
Tat (aa 1-16)	Advanced Biotechnologies Inc. (Columbia, MD, USA).
Proteínas de la familia de las ERM (Ezrina-Radixina-Moesina)	Cedido por el Dr. Sánchez-Madrid del Hospital de la Princesa de Madrid (Amieva & Furthmayr, 1995; Serrador et al., 2002)

La detección de interacciones antígeno-anticuerpo se realizó mediante los sistemas de detección de quimioluminiscencia “SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate” y “SuperSignal West Fento Chemiluminescent Substrate” (Pierce, Rockford, IL, USA).

1.4.- Reactivos

La tabla 4 resume los reactivos utilizados, la concentración empleada y las casas comerciales de las que se obtuvieron:

Tabla 4.- Reactivos utilizados

Anticuerpo	Concentración	Casa Comercial
[α - 32 P]-dCTP (actividad: 3000 Ci/mmol)	1 μ Ci/100 ng sonda	AmershamGE Healthcate (Little Chalfont Buckinghamshire, UK)
Ácido trifluoroacético (TFA)	0.1 o 5%	Sigma-Aldrich
Albúmina bovina (BSA)	1 μ g/ μ g proteína	Sigma-Aldrich
Bromuro de etidio	0,4 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Cicloheximida (CHX)	10 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Doxiciclina	1-2 μ g/ml	BD Bioscience Clontech (San José, CA, USA)
Ésteres de cianina Cy3, Cy5 y Cy2	8 pmol/ μ g prot	GE Healthcare
Faloidina-FITC	6U/ml	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
Fibronectina	20 o 75 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Fitohemaglutinina (PHA)	5 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)	25 ng/ml	Sigma-Aldrich
Geneticina	400 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Higromicina	800 μ g/ml	BD Bioscience Clontech
IL-2	300 UI/ml.	Chiron (Emeryville, CA, USA)
Ioduro de propidio	20 μ g/ml	Sigma-Aldrich
LMB	20nM	Sigma-Aldrich
Ligando del receptor Fas/CD95	20 μ g/ml	R&D System (Minneapolis, USA)
Peptidoglicano (PGN) de <i>Staphylococcus aureus</i> *	60 μ g/ml	Fluka (Milwaukee, Wis., USA)
poli dI-dC	0,33 μ g/ μ g proteína	Pharmacia (Peapack, NY, USA)
Quimiocina SDF-1 α /CXCL12	50 nM	Cedida por la Dra. Francoïse Baleux del Instituto Pasteur de Paris
RNasa A	50U/ml	Sigma-Aldrich
Tripsina porcina modificada	13 ng/ μ l	Promega
Tunicamicina	0,1 o 1 μ g/ml	Sigma-Aldrich

* = La dosis de PGN fue elegida de acuerdo a estudios previos que mostraron que una dosis de PGN de 50 – 60 μ g/ml puede inducir unión de NF- κ B al ADN así como incremento en la expresión de ARN de TLR2 en monocitos, células HeLa y DC (Liu, et al., 2001; Re & Strominger, 2004). La contaminación del PGN con LPS suministrado por Fluka fue previamente examinada por Kobayashi et al. (2000) mediante la prueba Limulus amebocyte y no se detectaron niveles significativos de contaminación.

1.5.- Sistemas comerciales

La tabla 5 resume los sistemas comerciales utilizados y la casa comercial donde se adquirieron:

Tabla 5.- Sistemas comerciales

Nombre del sistema comercial	Uso	Casa comercial
“β-Galactosidase Enzyme Assay System”	Cuantificación de la producción de β-galactosidasa	Promega (Madison, WI, USA)
“2-D Clean-Up Kit”	Concentraron de proteínas por precipitación)	GE Healthcare
“BD Pharmingen™ Annexin V : FITC Apoptosis Detection Kit II”	Cuantificación de apoptosis mediante el uso de Anexina V	BD Bioscience
“CD4 Negative Isolation Kit (T helper/inducer cells)”	Aislamiento negativo de células T CD ₄ ⁺	Dynal Biotech (Oslo, Noruega)
“Cytoskelfix Cell Fixative”	Permeabilización y fijación celular preservando las propiedades del citoesqueleto	Cytoskeleton (Denver, CO, USA)
“Dynabeads CD ₂₅ ”	Eliminación mediante selección positiva de células CD ₂₅ ⁺	Dynal Biotech
“ImProm-II™ Reverse Transcription System”	Amplificación ARN total por RT-PCR	Promega
“Luciferase Assay System”	Cuantificación de la actividad luciferasa en producida por la luciérnaga <i>Photinus pyralis</i>	Promega
“Promega Access RT-PCR”	Amplificación ARN total por RT-PCR	Promega
“Qiagen Plasmid Maxi Kit”	Purificación de ADN plasmídico	Qiagen (CA, USA)
“RC/DC Protein Assay Kit” Reactivo Bradford	Cuantificación de proteínas	GE Healthcare Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
“Renilla Luciferase Assay System”	Cuantificación de la actividad luciferasa producida por el organismo marino <i>Renilla reniformis</i>	Promega
“RNeasy Mini kit”	Purificación de ARN	Qiagen
“SilverQuest™ Silver Training Kit”	Tinción con plata de geles de poliacrilamida	Invitrogen
“Sample Grinding Kit”	Disrupción celular mecánica	GE Healthcare
Placas Transwell™ de 5µm de poro	Migración linfocitaria	Costar (CA, USA)
Sistema de expresión Tet-Off	Control de la expresión génica	BD Biosciences Clontech
“ELISA INNOTEST® HIV Antigen mAb”	Detección del antígeno p24 del VIH-1	Innogenetics (Barcelona, España)

1.6.- Plásmidos

Se han utilizado los siguientes plásmidos:

- **pEYFP-I κ B α , pEYFP-p65 y CMV-pEYFP:**
 - Los vectores pEYFP-I κ B α y pEYFP-p65 contienen la fusión del gen de la proteína fluorescente amarilla (YFP) con el gen de la proteína I κ B α o p65/RelA, respectivamente, bajo el control del promotor del CMV.
 - El vector CMV-pEYFP se utilizó como control de expresión de la proteína YFP bajo el control del promotor del CMV.
 - Estos tres plásmidos aparecen descritos en Birbach et al. (2002) y Schmid et al. (2000) y fueron amablemente cedidos por el Dr. Johannes Schmid, del Departamento de Investigación de Biología Vascular y Trombosis de la Universidad de Viena.
- **CMV- I κ B α :** el vector CMV- I κ B α contiene el gen I κ B α clonado en el vector pcDNA3.1 (+) bajo el control del promotor del CMV (Rodríguez et al. 1995).
- **CMV-Tat:** el vector CMV-Tat contiene el gen *Tat* (isoforma 101 aa) del VIH-1 clonado bajo el promotor del CMV (Malim et al. 1988).
- **pcDNA3.1 (+):** adquirido en Promega fue el vector transfectado como control negativo de los vectores CMV- I κ B α y CMV-Tat .
- **LTR-LUC, LTR- Δ κ B-LUC y LTR- Δ TAR-LUC:**
 - El vector LTR-LUC está descrito en Bachelierie et al., 1991 y contiene las regiones U3+R del LTR del VIH-1 (cepa LAI) desde el nucleótido –485 (*BglII*) hasta el +78 (*HindIII*) clonadas en el plásmido pc-LUC (Schwartz et al., 1990).
 - El vector LTR- Δ κ B-LUC se obtuvo a partir del vector LTR-LUC tras la eliminación de los dos elementos de respuesta - κ B y su sustitución por la secuencia consenso de *BclI* (Bachelierie et al., 1991; Duh et al., 1989).
 - En el vector LTR- Δ TAR-LUC se obtuvo a partir del vector LTR-LUC tras eliminar la región TAR y contiene las regiones del LTR del VIH-1 que van desde el nucleótido –485 (*BglII*) hasta el +38 (*SacI*). (Bachelierie et al., 1991).

- **LTR-GFP:** el vector LTR-GFP se generó clonando el ADNc de la proteína fluorescente verde (GFP), obtenido del plásmido pGFP (BD Bioscience), en el plásmido LTR-LUC.
- **3-κB-LUC:** el plásmido 3-κB-LUC contiene el gen de la luciferasa bajo el control de tres copias consenso -κB clonado en el sitio *BamHI* localizado hacia el extremo 5' del sitio de inicio de transcripción de la conalbúmina (Arenzana-Seisdedos et al., 1993).
- **pTet-Off, pTRE2hyg y pTRE2hyg-Tat:**
 - El plásmido pTet-Off, que permite el control de la expresión del gen clonado en el plásmido pTRE2hyg, se incluye en el sistema de control de expresión Tet-Off (BD Biosciences Clontech).
 - El plásmido pTRE2hyg-Tat se obtuvo clonando el gen viral Tat en el vector pTRE2hyg (BD Biosciences Clontech) utilizando las enzimas PvuII y NheI.
- **pNL4.3 y pNL4.3-Renilla:**
 - El vector pNL4.3 es un clon recombinante de las cepas NY5 (5') y LAV (3') que contiene el genoma completo del VIH-1 y genera una progenie viral infecciosa tras su transfección en numerosas líneas celulares, entre las que se incluyen los linfocitos T CD₄⁺ (Adachi et al., 1986).
 - El vector pNL4.3-Renilla se generó sustituyendo el gen *nef* del plásmido pNL4.3 por el gen de la luciferasa Renilla en las posiciones *NotI* (8797, introducida por mutagénesis dirigida), y *XhoI* (8887) (Garcia-Perez et al., 2007).
- **β-galactosidasa y TK-Renilla:**
 - El vector β-galactosidasa (Promega) contiene el gen *lacZ* bacteriano, que codifica la enzima β-galactosidasa, bajo el control del promotor SV-40.
 - El plásmido TK-Renilla (Promega) expresa el gen de la luciferasa Renilla bajo el control del promotor de la timidina.
 - El plásmido β-galactosidasa o el plásmido TK-Renilla se utilizaron como control interno para normalizar la eficacia de transfección.

1.7.- Oligonucleótidos

Para la detección del ARN mensajero se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la tabla 3.

Tabla 6.- Resumen de oligonucleótidos

Gen	Nombre	Secuencia (5'→3')	Tamaño producto
β-actina	β-Actina-S	ACACTGTGCCCATCTACGAGGGG	318 pb
	β-Actina-AS	TGATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3'	
TLR2*	TRL2-S	GGTTCAAGCCCCTTTCTTCTTTA	93 pb
	TLR2-AS	TGTGAGATGAGAAAAAGAGATGTTTC	
IκBα	IκBα-1S	AGCAGCGCCCGCAGCTCGTCCG	817 pb
	IκBα-1AS	CAAGTCCATGTTCTTTCAGCCCCTTGCAC	
	IκBα-2S	AGTACGAGCAGATGGTCAAGGA	
	IκBα-2AS	TGGCCTCCAAACACACAGTC	
Tat	Tat-S	GCAAGAAATGGAGCCAGTAG	251 pb
Tat	Tat-AS	GTACTACTTACTGCTTTGATAGAG	

* = oligonucleótidos descritos en Komai-Koma et al. (2004).

Para la amplificación del gen completo de Tat que fue posteriormente clonado en el vector pTRE2hyg se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

Tat-S-PvuII: 5'-CCCGGGGCAGCTGCAAGAAATGGAGCCAGTA-3'

La zona subrayada señala el sitio de corte de la enzima *PvuII*

Tat-AS-NheI: 5'-GGGCCCCGCTAGCCGACTAATCGCACGGAT-3'

La zona subrayada señala el sitio de corte de la enzima *NheI*

1.8.- Sondas

Como sonda de unión a NF-κB se utilizaron oligonucleótidos con el doble motivo consenso de unión a NF-κB tal y como se encuentra en el LTR del VIH-1:

Sonda-S: 5' AGCTTACAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGA 3'

Sonda-AS: 5' ATGTTCCCTGAAAGGCGACCCCTGAAAGGTCCCTTCGA 3'

1.9.- Tiras de gradientes de pH para ensayos de electroforesis de dos dimensiones y sondas para espectrometría de masas tipo MALDI

Se utilizaron tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG) prefabricadas (pH 3-11 no lineal, 24cm de longitud; GE Healthcare) para la primera dimensión de los ensayos de electroforesis diferencial en dos dimensiones (DIGE).

La mezcla de proteínas electroforéticamente separadas y posteriormente digeridas se depositó en una sonda MALDI AnchorChip (Brucker-Daltonics, Bremen, Alemania) de 600 μm .

1.10.- Equipos

La tabla 7 resume los equipos utilizados en los experimentos descritos en este trabajo.

Tabla 7.- Resumen de equipos

Equipo	Casa comercial
Aparato de electrotransferencia semi-húmeda “Electrophoresis Power Supply”	Consort (Turnhout, Bélgica)
Aparato IPGPhor II para la resolución de la primera dimensión en ensayos DIGE	GE Healthcare
Citómetro de Flujo FACScalibur	BD Biosciences
Contador de centelleo líquido LS 6000LL	Beckman (Coulter, Inc., CA, USA).
Electroporador convencional Easyjet Plus	Equibio (Middlesex, UK)
Electroporador Nucleofector	Amaza
Escáner para geles de plata Typhoon 9400 Imager	GE Healthcare
Espectrómetro de masas Ultraflex MALDI TOF/TOF equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS	Brucker-Daltonics
Espectrómetro UV/visible Ultrospec 1000E	Pharmacia
Estación de digestión de proteínas Proteineer dp	Brucker-Daltonics (Bremen, Alemania)
Luminómetro de placa Orion y de tubo Sirius	Berthold Detection Systems
Microscopio confocal Leica TCS-SP	Leica (Turku, Finlandia)
Microscopio confocal Radiance 2100	Bio-Rad
Secador de geles	BioRad
Termociclador Gene Amp® PCR System 2700	Applied Biosystems

2.- MÉTODOS

2.1.- Obtención y cultivo de células mononucleares de sangre periférica

Las PBMC se aislaron a partir de sangre de donantes sanos mediante centrifugación a 800 g durante 30 minutos a 22 °C en un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (BioWhittaker, Walkersville, MD, USA). A continuación, se recogió la fase que contenía las células mononucleares y se lavó tres veces mediante centrifugación a 480 g durante 10 minutos a 22 °C. Por último, las células se trataron con una solución tampón de lisis para eritrocitos (Sigma), se lavaron y se cultivaron a 37 °C en medio RPMI completo a una concentración de 2×10^6 células/ml.

2.2.- Obtención y cultivo de células T expandidas con PHA e IL-2

Las células expandidas con PHA e IL-2 se obtuvieron a partir de PBMC incubándolas durante 3 días en presencia de PHA y durante los 9 días consecutivos en presencia de IL-2, renovando la IL-2 del medio cada 2 ó 3 días. La IL-2 era eliminada del medio de cultivo 18 horas antes de la realización del experimento correspondiente. Este sistema de expansión de células T había sido previamente utilizado en nuestro laboratorio y se basaba en un método de expansión previamente descrito (Hazan, et al., 1990).

2.3.- Obtención y cultivo de linfocitos T CD_4^+ CD_{25}^- altamente purificados

Los linfocitos T CD_4^+ se aislaron a partir de 10^7 PBMC mediante selección negativa utilizando el sistema de aislamiento celular “ CD_4 Negative Isolation Kit (T helper/inducer cells)”. Los linfocitos CD_{25}^+ se eliminaron del total de linfocitos T CD_4^+ aislados mediante selección positiva de los mismos utilizando el sistema comercial “*Dynabeads* CD_{25} ”. El protocolo de aislamiento consistió en incubar las células lavadas durante 20 minutos a 4°C con la mezcla de anticuerpos proporcionada por el fabricante. Las células lavadas mediante centrifugación a 1430 rpm durante 8 minutos a 4°C se mezclaron con las partículas *Dynabeads* lavadas en una proporción 9/1 con PBS1x y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación suave. A continuación, la mezcla de células y partículas *Dynabeads* se sometió a un campo

magnético durante 2 minutos. En el caso del aislamiento negativo de células T CD_4^+ se recuperó la fracción de sobrenadante. En el caso del aislamiento positivo de células CD_{25}^+ se recuperó la fracción de partículas *Dynabeads* unidas a las células. En ambos casos, la fracción recuperada se lavó 3 veces con PBS1x y se resuspendió en medio de cultivo RPMI completo. La pureza de los linfocitos T $CD_4^+ CD_{25}^-$ se evaluó mediante citometría de flujo utilizando el programa CellQuest (BD Biosciences). Las células se marcaron con anticuerpos monoclonales frente a CD_4 y HLA-DR conjugados con FITC y anticuerpos frente a CD_{25} , CD_{69} y CD_3 conjugados con PE. El análisis mediante citometría de flujo mostró que el fenotipo de los linfocitos aislados era $CD_4^+ CD_{25}^- CD_{69}^- HLA-DR^-$, con una pureza superior al 95%. Estas células se utilizaron inmediatamente después de su aislamiento.

2.4.- Obtención y cultivo de células Jurkat Tet-Off y células Jurkat Tat

Las células Jurkat establemente transfectadas con la proteína Tat del VIH-1 se obtuvieron mediante el sistema de control de expresión Tet-Off. Este sistema permite la expresión inducible de un gen clonado en el plásmido pTRE2hyg cuando éste se co-expresa con el plásmido Tet-Off. El plásmido Tet-Off es el plásmido regulador del sistema y permite la inducción o la represión del gen gracias a que expresa la proteína tTA (transactivador controlado por doxiciplina). La proteína tTA es una proteína transactivadora que se une al elemento TRE (elemento de respuesta a tetraciclina/doxiciplina) presente en el extremo 5' del promotor mínimo del CMV en el plásmido pTRE2hyg y que activa la expresión del gen clonado. La doxiciplina bloquea la capacidad transactivadora de la proteína tTA y por lo tanto la expresión del gen clonado en el plásmido de respuesta pTRE2hyg. La presencia en el vector pTRE2hyg de un gen de resistencia a higromicina y en el vector Tet-Off de un gen de resistencia a geneticina, permite seleccionar los transfectantes estables mediante presión antibiótica en el medio de cultivo. La figura 11 muestra un esquema del sistema de control de expresión Tet-Off.

Para obtener células Jurkat que expresaran constitutivamente Tat utilizando el sistema de control de expresión Tet-Off se utilizaron células Jurkat establemente transfectadas con el plásmido regulador Tet-Off (células Jurkat Tet-Off) suministradas por el fabricante. Estas células se mantuvieron en cultivo en presencia de 800 μ g/ml de geneticina. Las células Jurkat Tet-Off se transfectaron con el plásmido pTRE2hyg-Tat y

para seleccionar los transfectantes estables, 48 horas después de la transfección, se añadieron al medio de cultivo 25 µg/ml diarios de higromicina hasta una concentración de 800 µg/ml. Durante todo este tiempo también se añadió al medio de cultivo 800 µg/ml de geneticina. Las células Jurkat Tet-Off establemente transfectadas con el plásmido pTRE2hyg-Tat (células Jurkat-Tat) se mantuvieron en cultivo con 800 µg/ml de geneticina y 400 µg/ml de higromicina.

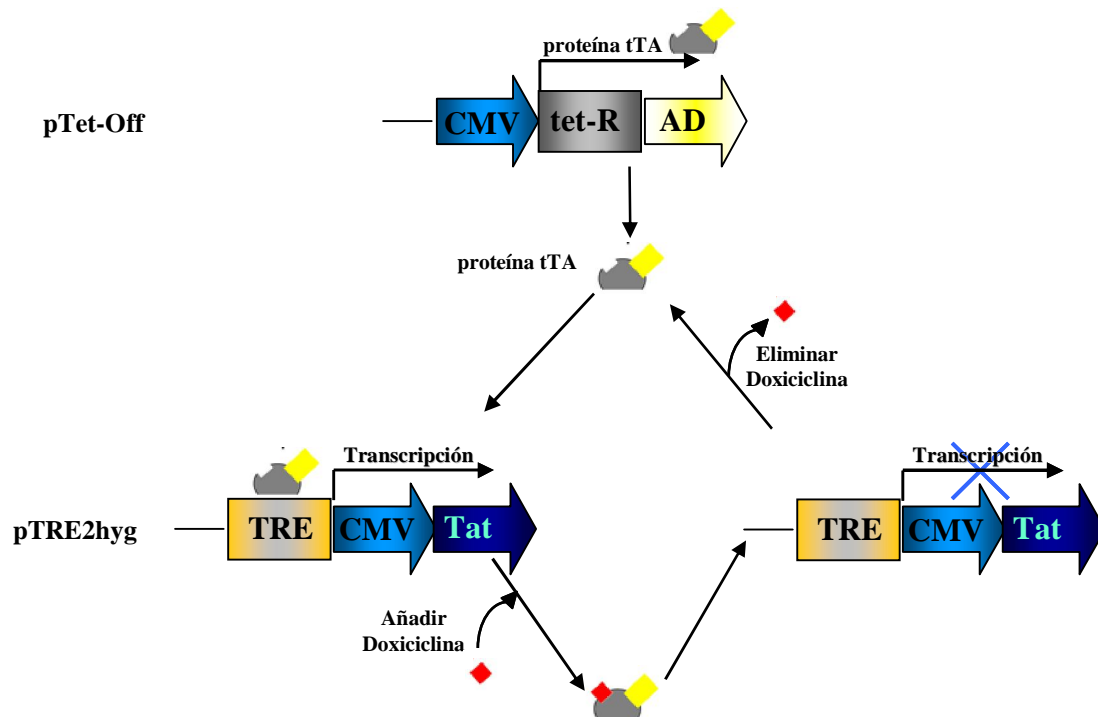


Figura 11.- Esquema del sistema de control de expresión Tet-Off

2.5.- Citometría de flujo

Los inmunofenotipajes de las células T expandidas con PHA e IL-2 y de linfocitos T CD_4^+ , así como todos los inmunomarcajes en superficie e intracelulares y la tinción con faloidina-FITC, se analizaron con un citómetro de flujo FACScalibur mediante el programa CellQuest. La señal de fondo se evaluó utilizando un anticuerpo monoclonal del mismo isotipo y marcado con el mismo fluorocromo que el anticuerpo utilizado en el ensayo. Las células vivas se acotaron mediante una región en un diagrama de puntos en el que se representaba el parámetro SSC (*side scatter*), que indica la complejidad estructural, frente al parámetro FSC (*forward scatter*), que indica el tamaño de las poblaciones celulares.

2.6.- Microscopía confocal

Las células se adhirieron a portaobjetos tratados con poli-L-lisina durante 30 minutos a temperatura ambiente y se fijaron con PBS1x-PFA2% y glutaraldehído 0,025% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS1x 10 minutos en agitación y dos veces con PBS1x-glicina 0,1% durante 10 minutos en agitación. A continuación se incubaron con PBS1x/Tritón X-100 0,1% durante 10 minutos en agitación a temperatura ambiente y se lavaron de nuevo tres veces durante 10 minutos con PBS1x. Después se trataron con NaBH₄ 1 mg/ml en PBS1x durante 10 minutos en agitación. Tras un último lavado con PBS1x, se lavaron con PBS/BSA 2%/saponina 0,05% durante 10 minutos en agitación y se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS1x/BSA 2% durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Después de tres lavados con PBS/BSA 2%/saponina 0,05% en agitación, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se lavaron dos veces con PBS1x/BSA 2%/saponina 0,05% y una vez con PBS1x, 10 minutos cada vez, en agitación. Se utilizó glicerol al 70% en PBS1x como medio de montaje. Los portas se conservaron a 4°C y en oscuridad hasta que se visualizaron en un microscopio confocal Radiance 2100.

Para realizar la grabación de microscopia confocal *in vivo*, los linfocitos T CD₄⁺ se depositaron sobre cubreobjetos recubiertos con fibronectina (20 µg/ml) y se incubaron a 37°C durante 30 minutos para facilitar su adhesión. Durante la grabación las células se mantuvieron a 37°C con CO₂ al 5% y las series confocales de fluorescencia se obtuvieron cada 90 segundos con un microscopio confocal Leica TCS-SP.

La tinción con un anticuerpo frente a proteínas de la familia ERM se realizó en células Jurkat Tet-Off y en células Jurkat-Tat adheridas durante 45 minutos a cubreobjetos recubiertos con fibronectina (75 µg/ml) en presencia o no de SDF-α. Tras la fijación con PBS1x-PFA2% y glutaraldehído 0,025% durante 10 minutos a temperatura ambiente las células se trataron durante 4 minutos a -20°C con “Cytoskelfix Cell Fixative” (Cytoskeleton), un agente que simultáneamente fija y permeabiliza, preservando intactas las características del citoesqueleto. A continuación, se incubaron secuencialmente con el anticuerpo primario y secundario durante media hora a temperatura ambiente. Las muestras se montaron sobre portacristales utilizando medio de montaje mowiol (Calbiochem, Darmstadt, Germany) y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su visualización en un microscopio confocal Radiance 2100.

2.7.- Preparación de extractos proteínas citosólicas y nucleares

Se utilizaron un mínimo de 25-50 millones de células por cada punto experimental. El protocolo para la extracción de proteínas citosólicas y nucleares ha sido previamente descrito (Lain de Lera, 1999). Las células se lavaron en PBS1X y se resuspendieron en 500 μ l de tampón A (HEPES 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, sacarosa 0,5 M, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) 1 mM pH 8, espermidina 0,5 mM, espermina 0,15 mM, Tritón X-100 0,2%, PMSF 1 mM, leupeptina 0,5 μ g/ml, pepstatina 0,5 μ g/ml, aprotinina 0,2 U/ml y β -mercaptoetanol 7 mM), se lisaron durante 3 minutos a 4°C y se centrifugaron a 6500 rpm durante 3 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido en este paso constituye la fracción citosólica. El *pellet* celular se lavó con 500 μ l de tampón B (HEPES 10 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM pH 8, espermidina 0,5 mM, espermina 0,15 mM, glicerol 25%, PMSF 1 mM, leupeptina 0,5 μ g/ml, pepstatina 0,5 μ g/ml, aprotinina 0,2 U/ml y β -mercaptoetanol 7 mM). Tras una nueva centrifugación (6500 rpm, 4°C, 3 minutos), el *pellet* obtenido se resuspendió en 100 μ l de tampón C (HEPES 10 mM pH 8, NaCl 350 mM, EDTA 1 mM pH 8, Tritón X-100 0,5%, espermidina 0,5 mM, espermina 0,15 mM, glicerol 25%, PMSF 1 mM, leupeptina 0,5 μ g/ml, pepstatina 0,5 μ g/ml, aprotinina 0,2 U/ml y β -mercaptoetanol 7 mM). La elución de las proteínas del *pellet*, que constituyen la fracción nuclear, se realizó mediante agitación suave a 4°C durante 4 horas o toda la noche. La fracción nuclear se recogió en el sobrenadante después de una centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. La concentración de proteínas se determinó mediante la reacción de Bradford utilizando un espectrómetro UV/visible Ultrospec 1000E.

2.8.- Ensayo de retardo en gel

2.8.1.- Marcaje de la sonda - κ B

Cada una de las hebras complementarias se resuspendió en solución STE (NaCl 0,1 M, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM) y se hibridaron incubando a 88°C durante 2 minutos, 65°C durante 10 minutos y 5 minutos a 24°C.

La reacción de marcaje se realizó en un volumen final de 20 μ l, utilizándose 100 ng de la sonda hibridada, 1 μ Ci de [α -³²P]-dCTP (GE Healthcare) con una actividad de 3000 Ci/mmol, 1 μ l de tampón de reacción (MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM y β -mercaptoetanol 1 mM), los nucleótidos dATP, dGTP y dTTP a una

concentración de 2mM (GE Healthcare) y 1 µl de enzima Klenow (Boehringer-Mannheim, Ingelheim am Rhein, Alemania). La reacción se incubó 45 minutos a 37°C. La sonda marcada se purificó en una columna de Sephadex G-10 (BD Biosciences Clontech), siguiendo las instrucciones del fabricante. La actividad específica de la sonda marcada se calculó en un contador de centelleo líquido LS 6000LL.

2.8.2.- Ensayo de unión ADN-proteína

La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl. En cada ensayo se utilizaron 3 µg de extracto de proteína nuclear, 1 µg de poli dI-dC (Pharmacia) como inhibidor específico, 3 µg BSA (Boehringer-Mannheim), 4 µl de tampón de unión 5X (HEPES 37,5 mM pH 8, NaCl 175 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 0,25 mM pH 8, DTT 2,5 mM y glicerol 37,5%) y 50.000 cpm (cuentas por minuto) de sonda marcada. Tras una incubación de 20 minutos a temperatura ambiente, las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 6% en TBE 0,5X (Tris 25 mM, ácido bórico 25 mM y EDTA 0,5 mM pH 8) y se migraron durante 90 minutos a 180 V. El gel se deshidrató en un secador de calor y se autorradiografió.

2.9.- Ensayo de Western-Blot

Se migraron 10 µg de extractos citosólicos o nucleares obtenidos de células T, células Jurkat Tet-Off y células Jurkat-Tat tratadas o no con diferentes estímulos bajo diferentes condiciones en un gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 10%. Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare) mediante un aparato de electrotransferencia semi-húmeda “Electrophoresis Power Supply” usando la cantidad apropiada de tampón de transferencia (glicina 192mM, Tris-base 25 mM y metanol 20%). La transferencia se desarrolló a 32mA por gel de 8x5 cm de área. Las membranas se bloquearon por incubación en agitación a 4°C durante toda la noche con leche desnatada en polvo al 5% en PBS1X/Tween-20 0,1%. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con los anticuerpos específicos durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos con PBS1x/Tween-20 0,1%, se incubaron con anticuerpos anti-inmunoglobulinas de conejo o de ratón conjugados con HRP durante una hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 10 minutos

con PBS1x/Tween-20 0,1%, se realizó la detección de las interacciones antígeno-anticuerpo mediante un sistema de detección quimioluminiscente.

2.10.- Ensayo de inmunoprecipitación

Para la realización de la técnica de inmunoprecipitación se utilizaron 100 µg de extracto proteína citosólica o nuclear obtenidos a partir de células T. Los extractos se incubaron con 5 µg de un anticuerpo frente a p65/RelA conjugado con bolas de agarosa (Santa Cruz Biotechnology) en tampón RIPA (PBS1x, 0,1% de SDS, 1% NP-40) con deoxicolato sódico (DOC) al 0,5%, preparado en el momento, en un volumen final de 500 µl, y se mantuvieron en agitación durante toda la noche a 4°C. La inmunoprecipitación se recogió mediante centrifugación a 2.500 rpm durante 5 minutos a 4°C y se lavó cuatro veces con tampón RIPA/DOC. Las proteínas inmunoprecipitadas se analizaron mediante *western-blot* e inmunomarcaje utilizando anticuerpos específicos tal y como se describió anteriormente.

2.11.- Purificación de ADN plasmídico

Los plásmidos se purificaron utilizando el sistema “Qiagen Plasmid Maxi Kit” (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos métodos se basan en la lisis alcalina y la purificación del ADN por medio de columnas de intercambio iónico.

2.12.- Sistemas de transfección

Las transfecciones, transitorias o estables, se realizaron con un electroporador Easyjet Plus (Equibio). Brevemente, 5-10x10⁶ de linfocitos T CD₄⁺, células T expandidas con PHA e IL-2 o células Jurkat se resuspendieron en 350 µl de RPMI sin ningún suplemento y se mezclaron con un 1µg de ADN plasmídico por cada 10⁶ células en una cubeta de electroporación de 4 mm de separación entre electrodos (Equibio). Las condiciones de transfección fueron 280 V para células Jurkat, 320 V para linfocitos T CD₄⁺ y 340 V para células T expandidas con PHA e IL-2, y una capacitancia de 1500 µF en todos los casos. Después de la transfección, las células se incubaron en RPMI

suplementado, a 37°C durante 18 horas. El plásmido β -galactosidasa se utilizó como control de eficacia de transfección.

Además, los linfocitos T CD4⁺ y las células T expandidas con PHA e IL-2 se nucleofectaron con los plásmidos pEYFP-I κ B α , pEYFP-p65, CMV-pEYFP o pNL4.3 utilizando el sistema “Human T cell nucleofector™” (Amaza) según las instrucciones del fabricante. En breve, 5x10⁶ linfocitos T CD4⁺ se transfectaron con 2 μ g de ADN plasmídico bajo las condiciones del programa de electroporación U-14 del Nucleofector de Amaza. El plásmido TK-Renilla se utilizó como control de eficacia de transfección.

2.13.- Sistemas de infección viral

Los linfocitos T CD4⁺ nucleofectados con el plásmido pNL4.3 junto con el plásmido CMV-I κ B α o con el plásmido pcDNA3.1, se activaron bien con anticuerpos frente a CD3 junto con IL-2 o bien con PHA junto con IL-2. Los cultivos se mantuvieron en presencia de los estímulos y la replicación del VIH-1 se determinó los días 5 y 7 después de la transfección, cuantificando los niveles de la proteína p24 del VIH-1 en los sobrenadantes del cultivo.

Las partículas virales de NL4.3-Renilla se generaron mediante una transfección con fosfato cálcico de células 293T con el plásmido pNL4.3-Renilla. Las células 293T se cultivaron durante 24 horas en una placa de 6 pocillos a una concentración de 5x10⁵ células por pocillo. Las células se mantuvieron en medio fresco durante las 4 horas previas a la transfección. La mezcla de transfección, que contenía 200 μ l de HBS (HEPES 50mM, Na₂HPO₄ 1.5mM, NaCl 140mM, pH 7.05), 200 μ l de CaCl₂ 250 mM y 5 μ g del plásmido pNL4.3-Renilla, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se añadió gota a gota sobre las células. Tras incubar las células durante 12 horas a 37°C y CO₂ al 5% se eliminó la mezcla de transfección y se añadió medio fresco al cultivo. Tras 12 horas de incubación, las células fueron tripsinizadas, lavadas y se analizó la expresión de Renilla. Los sobrenadantes, que contenían las partículas virales, fueron almacenados -80 °C.

Las células T expandidas con PHA e IL-2 se distribuyeron en placas de 96 pocillos a una concentración de 2x10⁵ células por pocillo y se infectaron con 40 μ l de los sobrenadantes recogidos tras la transfección de las células 293T (equivalentes a 15 ng de proteína p24) en un volumen final de 200 μ l y se activaron bien con anticuerpos

frente a CD₃ o bien con PGN. A las 48 y 72 horas post-infección la replicación del VIH-1 se evaluó mediante dos sistemas diferentes. El primer sistema consistió en la cuantificación de los niveles de la proteína p24 del VIH-1 en los sobrenadantes del cultivo. El segundo sistema consistió en la cuantificación de las unidades relativas de luz (URL) de los sobrenadantes obtenidos tras lisar las células con el sistema “Renilla Luciferase Assay System” utilizando un luminómetro de placa Orion.

2.14.- Detección de la actividad luciferasa

La actividad luciferasa producida por la luciferasa de la luciérnaga *Photinus pyralis* o la luciferasa del organismo marino *Renilla reniformis* se detectaron respectivamente con los sistemas comerciales “Luciferase Assay System” o “Renilla Luciferase Assay System”, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células fueron lisadas con 100 µl de tampón de lisis y tras su agitación en vórtex se mantuvieron durante 30 minutos en agitación suave a 4°C. La actividad luciferasa de los extractos se evaluó en un luminómetro tras mezclar 20µl del lisado celular con 40 µl de sustrato.

2.15.- Detección de la actividad β-galactosidasa

La actividad producida por la presencia de la encima β-galactosidasa se midió con los reactivos del sistema “β-Galactosidase Enzyme Assay System” (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente las células fueron lisadas con 150 µl de tampón de lisis, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante de esta centrifugación se mezcló con 150µl del tampón de ensayo y tras una incubación a 37°C de al menos 30 minutos la reacción se paró con carbonato sódico 1M. La intensidad de la coloración desarrollada se cuantificó en 100µl de esta mezcla en un luminómetro ($\lambda = 420$).

2.16.- Detección de la proteína p24 del VIH-1

Los niveles de la proteína p24 del VIH-1 se cuantificaron en los sobrenadantes de las células infectadas mediante el ensayo “ELISA INNOTEST® HIV Antigen mAb” (Innogenetics).

2.17.- Purificación y detección del ARN total

En los protocolos para la preparación, amplificación de muestras y detección de los productos de PCR se consideraron las recomendaciones convencionales para evitar la contaminación de muestras o reactivos con productos de amplificación de PCR o con controles positivos (Kwok & Higuichi, 1989).

2.17.1.- Purificación de ARN Total

La extracción del ARN total se realizó con el sistema “RNeasy Mini kit” (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En breve 5×10^6 células T fueron lisadas con el buffer de lisis, incluido en este sistema de purificación comercial, al que se le añadió β -mercaptoetanol. Las células T lisadas son homogenizadas y tratadas con etanol 70%. El volumen obtenido fue filtrado a través de columnas comerciales, en las que queda retenido el ARN total. El ARN retenido se lavó con etanol (96%) y se eluyó con tampón *RPE* facilitado por el fabricante. La cantidad y pureza del ARN obtenido se cuantificaron en un espectrómetro UV/visible.

2.17.2.- Detección de ARN Total

El diseño de los oligonucleótidos específicos se realizó para amplificar regiones conservadas de los ARNm de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y Tat. Las secuencias disponibles en la base de datos GeneBank se utilizaron para realizar alineamientos informáticos utilizando el programa Macaw 2.0.5 (“*Multiple Alignment Construction and Analysis Workbench*”, NCBI, Bethesda, MD).

La expresión de ARNm de TLR2, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y Tat se evaluó mediante amplificación por RT-PCR. Para amplificar el ARNm de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ se realizó una PCR anidada después de

la primera amplificación por RT-PCR. La expresión de ARNm de β -actina se utilizó como control interno para validar la medida de la expresión génica.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Gene Amp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) utilizando los oligonucleótidos descritos en la tabla 6 en la sección de “Materiales”.

2.17.2.a.- RT-PCR para la amplificación de TLR2 e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$

La reacción de RT-PCR para la amplificación de TLR2 e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ se realizó con el sistema “Promega Access RT-PCR” (Promega). A cada tubo se le dispensó la siguiente mezcla de reacción: 10 μl de tampón 5X, MgSO_4 2mM, dNTPs 0.2mM, un par de oligonucleotidos específicos 0.4 μM , 5U de RT y 5U de ADN polimerasa *Tlf*. Se añadieron 2 μg de ARN y se aplicaron las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo inicial de retrotranscripción de 48°C durante 45 minutos y 95°C durante 10 minutos; 45 ciclos de amplificación, constando cada ciclo de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C/55°C (para amplificar $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y TLR2, respectivamente) durante 1 minuto y elongación a 68°C durante 30 segundos/1 minuto (para amplificar respectivamente $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y TLR2); finalmente, los tubos se incubaron a 68°C durante 10 minutos para la elongación final.

En la reacción de PCR anidada para la amplificación específica de ARNm de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ se utilizaron reactivos de Applied Biosystems. Cada tubo de reacción contenía: 5 μl del tampón II 5x, MgCl_2 2mM, dNTPs 0.2 mM, oligonucleotidos específicos $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -2A e $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -2AS a 0.2 μM cada uno, y 2.5 U de ADN polimerasa AmpliTaq. Se añadieron 2 μl de la primera reacción de amplificación. Las condiciones del termociclador fueron: 95°C durante 10 minutos; 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 68°C durante 30 segundos; y una incubación final de 68°C durante 10 minutos.

2.17.2.b.- RT-PCR para la amplificación de Tat

Para la amplificación por RT-PCR del ARNm de Tat en primer lugar se sintetizó el ADNc y a continuación éste se amplificó mediante PCR utilizando el sistema “ImProm-II™ Reverse Transcription System de Promega”. Para el primer paso de la

reacción se utilizó la siguiente mezcla de reacción: 22 µl de tampón de amplificación compuesto de: Tris-HCl 50mM, pH 8.3; MgCl₂ 10mM, espermidina 0.5 M y DTT 10 mM DTT, 0.5 µl de cada dNTP y oligonucleótidos tipo *random* 3,3 µM, RNAsin y 1U/ml de la enzima *ImProm- IITM Reverse transcription*. Se añadieron 2 µg de ARN extraído de células MT-2 infectadas con el virus NL-4.3, células Jurkat Tet-Off, células Jurkat-Tat y de los controles negativos. Para la obtención del ADNc la mezcla se incubó a 42°C durante 60 minutos seguida de una incubación a 90°C durante 10 minutos y se llevó a un volumen final de 40 µl mediante la adición de agua. El plásmido CMV-Tat se utilizó como control positivo. Para amplificar mediante PCR el gen *Tat*, 8 µl de la reacción de ADNc y 1µg del plásmido CMV-Tat se añadieron a una mezcla de reacción que contenía: dNTPs 50 µM, un par de oligonucleótidos específicos (0.1 mM cada uno) y 2U de la enzima ADN polimerasa *Taq*. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95°C durante 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación 55°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 1 minuto; y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

2.17.2.c.- Detección de productos de PCR

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1-2% con 5µg/ml de bromuro de etidio en tampón Tris-acetato 0.5x. Las imágenes de los geles se adquirieron en un aparato BioRad Geldoc 2000 (BioRad). El análisis densitométrico se realizó con el programa QuantityOne de Bio-Rad.

2.18.- Análisis del proteoma celular basado en electroforesis bidimensional y espectrometría de masas de tipo MALDI-MS(/MS)

El análisis proteómico de las células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat se realizó en la Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares en Madrid. La figura 12 muestra un esquema general del análisis del proteoma basado en electroforesis bidimensional y espectrometría de masas de tipo MALDI-MS(/MS).

2.18.1- Ensayos de electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones

2.18.1.a.- Preparación de las muestras

Los extractos proteicos de las muestras se prepararon a partir de células Jurkat Tet-Off, usadas como control, y de células Jurkat-Tat. Las células se lisaron mediante disrupción mecánica utilizando el sistema “Sample Grinding Kit” (GE Healthcare) y un tampón de lisis (Tris-HCl 30mM, pH 8.5 4°C; urea 6M; tiourea 2M; CHAPS al 4%; DTT 50mM) durante 60 minutos. Las proteínas se purificaron y se concentraron mediante precipitación con el sistema “2-D Clean-Up Kit” (GE Healthcare) y se resuspendieron en tampón de lisis sin DTT durante 2 horas. La concentración de proteínas se midió con el sistema “RC/DC Protein Assay Kit” (Bio-Rad). Las muestras se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su utilización.

La figura 2 muestra un esquema general del análisis del proteoma basado en el ensayo DIGE que se realizó en células Jurkat-Tat y en células Jurkat Tet-Off.

2.18.1.b.- Marcaje de proteínas con fluoróforos para DIGE

Las muestras de proteínas anteriormente obtenidas se marcaron según las instrucciones del fabricante. Brevemente, 50 µg de cada extracto proteico se marcó separadamente a 0°C, en oscuridad y durante 30 minutos con 400 pmoles de ésteres N-hidroxisuccinimida de colorantes de cianina (Cy3 y Cy5) disueltos en dimetil formamida al 99.8% (Sigma-Aldrich). El control interno, que contiene una mezcla equimolar de todos los extractos proteicos, se marcó con Cy2. Las muestras marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5 se mezclaron y se añadió el mismo volumen de tampón de rehidratación 2x (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%) que además contenía DTT 50mM y buffer IPG al 1%. Esta mezcla se sometió a electroforesis en dos dimensiones (2D).

2.18.1.c- Electroforesis en 2D

La electroforesis 2D se realizó tal y como está descrita en Görg, et al. (2005) y en Rabilloud (1998).

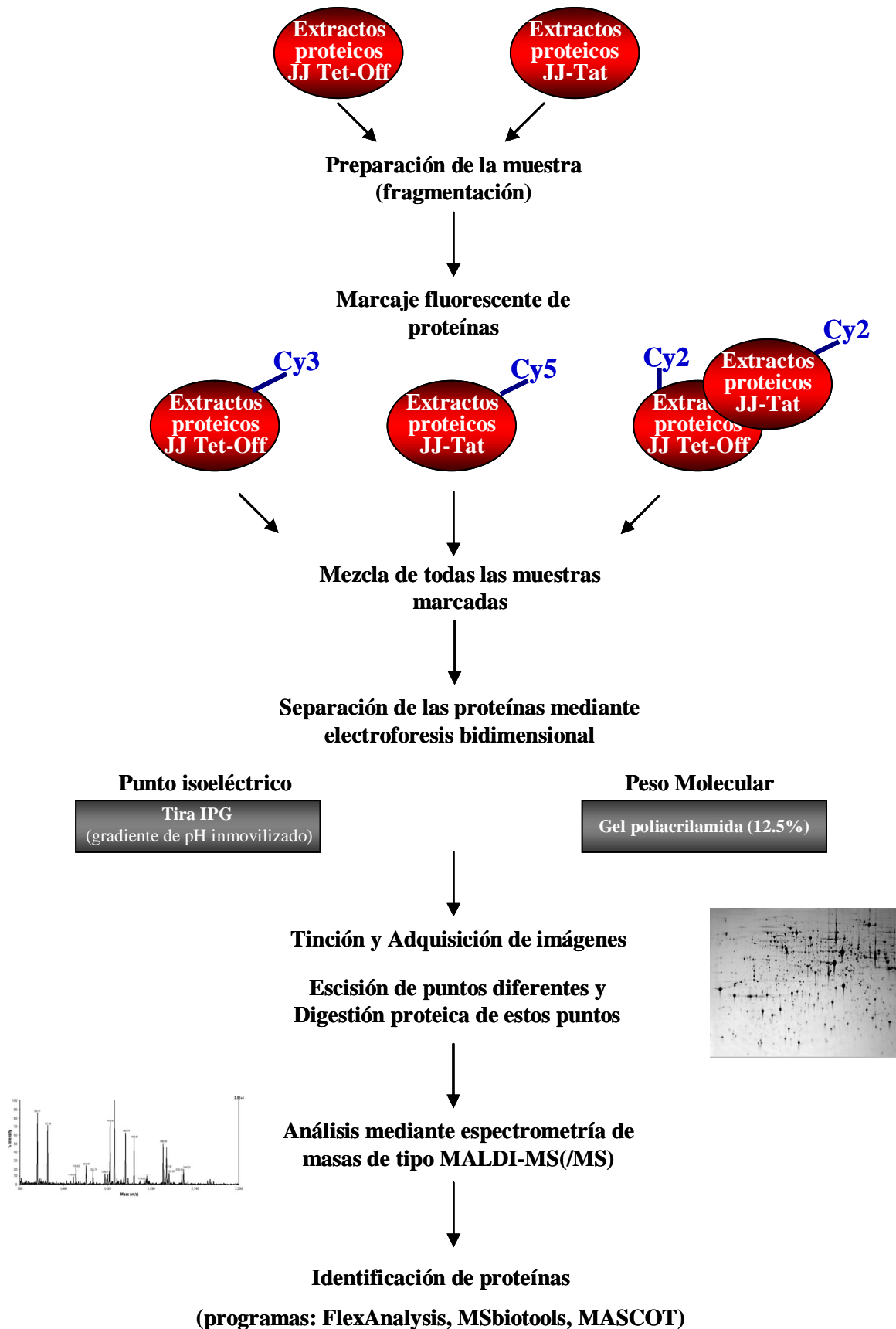


Figura 12.- Esquema general del análisis del proteoma basado en electroforesis bidimensional y espectrometría de masas de tipo MALDI-MS(/MS).

En la primera dimensión o isoelectroenfoque se utilizaron tiras IPG prefabricadas con gradiente de pH 3-11 no lineal de 24cm de longitud. Las muestras se aplicaron en las tiras IPG previamente rehidratadas con 450µl de tampón de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M, CHAPS al 2%, tampón IPG al 0,75% pH 3-11 no lineal, DeStreak 10mM (GE Healthcare) y una cantidad mínima de azul de bromofenol). En cada tira IPG se cargaron 100-150 µg de proteína y la primera dimensión de la electroforesis se desarrolló en el aparato IPGPhor II, siguiendo un incremento gradual del voltaje hasta 300 V durante 3 horas, un incremento en gradual desde 300 V hasta 1000 V durante 4 horas y un incremento gradual desde 1000 V hasta 8000V durante dos horas, y después se mantuvo constante en 8000 V. A continuación, las tiras IPG se equilibraron dos veces durante 15 minutos con Tris-HCl 50mM pH 8,8, urea 6M, glicerol al 30%, SDS 2%, y un poco de azul de bromofenol. La primera solución de equilibrado contenía DTT 2%, y en el segundo equilibrado contenía yodoacetamina al 4% en lugar de DTT.

La segunda dimensión (electroforesis SDS-PAGE) se realizó en geles de poliacrilamida homogéneos al 12.5%, de 1 mm de grosor y de dimensiones 26 x 22 cm. La electroforesis se desarrolló a corriente constante (45 minutos a 2 mA por cada gel y 4 horas a 20mA por gel) y a 25°C.

2.18.1.d.- Tinción de plata de geles de poliacrilamida

Los geles se tiñeron utilizando el sistema “SilverQuest™ Silver Training Kit” conforme a las instrucciones del fabricante. En resumen los geles fijados (etanol 40%, ácido acético 10%, 5 minutos) y lavados con etanol 10% se tratan con un reactivo que aumenta la sensibilidad de la tinción. Tras dos intensos lavados con agua, los geles son teñidos con plata durante 15 minutos.

2.18.1.e.- Adquisición y análisis de imágenes de los geles de plata

Los geles se escanearon en un Typhoon 9400 Imager y se analizaron con el software DeCyder versión 5.01. Se realizó el análisis diferencial dentro de cada gel y el análisis de la variación biológica.

2.18.2.- Aislamiento de proteínas de geles 2D

Los puntos de proteínas de los geles teñidos con plata se recortaron manualmente de los geles y se digirieron automáticamente con una estación de digestión de proteínas Proteineer DP (Broker-Daltonics, Bremen, Alemania). El protocolo de digestión utilizado fue el descrito por Schevchenko et al. (1996), con algunas variaciones: los geles se sometieron a reducción con DTT 10mM en bicarbonato amónico 50mM, se lavaron con bicarbonato amónico 50mM y acetonitrilo y se secaron bajo una corriente de nitrógeno. Tripsina porcina modificada (Promega) a una concentración final de 13 ng/μl en bicarbonato amónico a 50mM se añadió a las piezas de gel secas y la digestión se desarrolló a 37°C durante 6 horas. Por último, TFA al 5% (95% de pureza) se añadió para la extracción peptídica.

2.18.3.- Espectrometría de masas de tipo MALDI-MS(/MS) y búsqueda de proteínas en bases de datos

Las proteínas separadas electroforéticamente y posteriormente digeridas se analizaron mediante espectrometría de masas (MS) seguida de una exhaustiva búsqueda en bases de datos para poder identificar dichas proteínas. Se aplicó una espectrometría de masas de tipo MALDI (MALDI-MS). En concreto se realizó un ensayo MALDI-MS basado en la identificación de fragmentos peptídicos de secuencia específica o también conocida como espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Este método combina al menos dos espectrómetros de masas en tiempo y en espacio, lo que permite obtener más información acerca de la secuencia primaria de los péptidos analizados. La espectrometría tipo MALDI-MS(/MS) utilizada lleva además un sistema de “tiempo de vuelo en tándem” TOF/TOF, que se usa los espectros primarios de péptidos de hasta 35-40 kD.

Una alícuota de la solución de proteínas digeridas se mezcló con una alícuota de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Brucker-Daltonics) en acetonitrilo acuoso al 33% y TFA al 0,1%. Esta mezcla se depositó en una sonda MALDI AnchorChip (Brucker-Daltonics) de 600 μm y se dejó secar a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS(/MS) se obtuvieron en un espectrómetro de masas Ultraflex MALDI TOF/TOF equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS (Brucker-Daltonics). Los datos de masa peptídica se analizaron en detalle utilizando el programa FlexAnalysis (Brucker-

Daltonics). Los datos obtenidos de los péptidos identificados se combinaron utilizando el programa MS Biotoools (Brucker-Daltonics) para poder buscar coincidencias en la base de datos NCBIInr utilizando el programa MASCOT (Matriz, Science, London, UK) (Perkins, et al., 1999).

2.19.- Análisis de la funcionalidad del citoesqueleto

2.19.1.- Migración linfocitaria

Los ensayos de migración linfocitaria o quimiotaxis se realizaron en placas Transwell™ (Costar) de membranas de policarbonato de 6,5 mm de diámetro y 5µm de tamaño de poro. Brevemente, 1×10^5 células Jurkat-Tat o Jurkat Tet-Off se resuspendieron en medio de cultivo suplementado y se depositaron en la cámara superior, en presencia o no SDF-1α en la cámara inferior. Las células se incubaron durante 2 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ para permitir la migración a través de la membrana de policarbonato. Las células migradas se recogieron de la parte inferior de la cámara Transwell, se tiñeron con yoduro de propidio y se cuantificaron mediante un citómetro de flujo permitiendo el flujo de la muestra durante 1 minuto. La capacidad de migración en respuesta al estímulo quimioatrayente SDF-1α se normalizó conforme a la migración del mismo tipo celular en ausencia de SDF-1α.

2.19.2.- Polimerización de actina

La polimerización de los filamentos de actina se estudió en presencia o no de la quimiocina SDF-1α durante 15 segundos a 37°C. A continuación, las células se fijaron y permeabilizaron simultáneamente con PFA2% y Tritón X-100 0,1%, y los filamentos de actina se marcaron con faloidina conjugada con FITC durante 15 minutos a 37°C. La faloidina es una toxina típica del hongo *Amanita phalloides* que se une a los filamentos de actina (actina polimerizada), estabilizándolos (Faulstich et al., 1988; Vetter, 1998). La actina intracelular polimerizada se determinó mediante citometría de flujo. La fluorescencia propia de las células se utilizó como control negativo.

2.19.3.- Ensayo de polarización celular

La capacidad de polarización frente a SDF-1 α se estudió en células Jurkat-Tat en comparación con las células Jurkat Tet-Off. Las células se adhirieron a portaobjetos recubiertos con fibronectina (75 μ g/ml) y se mantuvieron 45 minutos a 37°C en presencia o no de SDF-1 α . Seguidamente se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo frente a proteínas de la familia ERM y un anticuerpo secundario conjugado con Texas-Red (Molecular Probes). El marcaje se observó en un microscopio confocal (BioRad). El índice de polarización se calculó según el tanto por ciento de la proporción de células polarizadas en relación a las células totales contadas en 15 campos diferentes elegidos de manera aleatoria.

2.20.- Estudio de la apoptosis celular

2.20.1.- Análisis del ciclo celular

Células Jurkat-Tat y sus controles, las células Jurkat Tet-Off, se incubaron con tunicamicina (0,1 ó 1 μ g/ml) durante 18 horas. La inducción de apoptosis se midió cuantificando el contenido de ADN en cada fase del ciclo celular. Para realizar el estudio del ciclo celular las células se fijaron con etanol 70% a -20°C durante 30 minutos a 4°C, se lavaron con PBS1x y se trataron con RNasa A 30 minutos a 37°C. Estas células se analizaron en un citómetro de flujo después de tratar las células con yoduro de propidio 0.003%.

2.20.2.- Análisis de apoptosis temprana mediante Anexina V

Células Jurkat-Tat y sus controles, las células Jurkat Tet-Off, se incubaron con un anticuerpo frente al receptor de muerte celular Fas/CD95. La inducción de apoptosis temprana se midió cuantificando la expresión en superficie de fosfatidil serina, un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana celular y que se expone en la superficie de las células que van a entrar en apoptosis. Para detectar la presencia de fosfatidil serina, las células se tiñeron con Anexina V, ligando específico de la fosfatidil serina, conjugada con FITC, manteniendo una concentración determinada de

calcio según las especificaciones del fabricante (BD Biosciences). El porcentaje de células que se tiñeron con Anexina V se determinó en un citómetro de flujo.

2.21.- Análisis estadístico

La significación estadística de las diferencias observadas en la replicación del VIH-1 en las distintas condiciones experimentales, se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney utilizando el programa SPSS versión 14 (Addlink Software Científico, Madrid, España).

En los experimentos de transfección de linfocitos T CD_4^+ con el vector pNL4.3 las diferencias estadísticas se evaluaron entre los valores medios de producción de p24 en condiciones de sobreexpresión de $I\kappa B\alpha$. En estas condiciones, los valores $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

En los experimentos de infección de células el virus NL4.3-Renilla, las diferencias estadísticas en la producción de p24 y de actividad luciferasa se evaluó entre las diferentes condiciones experimentales (basal, anti- CD_3 , PGN) en un mismo tiempo. Los valores $p < 0,001$ se consideraron estadísticamente significativos.

1.- ESTUDIO DEL TRÁFICO NUCLEOCITOSÓLICO DE NF- κ B/I κ B α EN LINFOCITOS T CD₄⁺ DE SANGRE PERIFÉRICA NO ACTIVADOS Y SU IMPLICACIÓN EN LA REPLICACIÓN DEL VIH-1

1.1.- Caracterización del estado de activación de las células T expandidas con PHA e IL-2

Para analizar la presencia de las proteínas NF- κ B e I κ B α en el núcleo de linfocitos T obtenidos a partir de PBMC, así como para la extracción de ARNm se necesitan aproximadamente 50×10^6 células para cada punto experimental. Por lo tanto, la cantidad de células T no activadas obtenidas directamente a partir de un único donante no es suficiente para realizar algunos de los experimentos necesarios para llevar a cabo los objetivos planteados en esta tesis. Por esta razón, las células T fueron expandidas mediante el tratamiento con PHA e IL-2 siguiendo un protocolo puesto a punto en nuestro laboratorio y basado en un método previamente descrito (Hazan, et al., 1990). El análisis de la expresión en superficie de marcadores de activación en estas células mostró una población muy homogénea con expresión superior al 98% de CD₃ y de CD₂ (Fig. 13). La presencia de poblaciones de linfocitos Natural Killer (NK) o linfocitos B fue inferior al 2%, como se observó en el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de CD₅₆ o CD₁₉. Como se indica en la sección de Materiales y Métodos, durante las 18 horas previas a la realización de los experimentos, las células expandidas con PHA e IL-2 se incubaron en ausencia de IL-2 con objeto de disminuir su estado de activación. Tras la depleción de IL-2, estas células T presentaron en su superficie los marcadores de activación celular CD₂₅ y CD₆₉ (Fig. 13). Sin embargo, no se detectó la presencia de complejos NF- κ B activos (heterodímeros p50/p65) en el núcleo de estas células, como se observó mediante experimentos de retardo en gel (Fig. 14A, carril 1). El tratamiento con PMA indujo la formación de complejos p50/p65 (Fig. 14A, carril 2), como se ha descrito previamente (Laín de Lera et al. 1999). Por último se descartó que la transfección de PBMC mediante electroporación convencional (electroporador de Equibio, 4 mm de separación entre electrodos) o con el sistema de nucleofección (Amaxa) activara la translocación nuclear y la unión al ADN de los heterodímeros activos p50/p65. Con este objetivo, extractos nucleares obtenidos a partir de PBMC electroporados mediante ambos métodos con un vector control (pcDNA3.1)

se analizaron en geles de retardo. La transfección en sí misma no indujo la activación de NF- κ B (Fig. 14B).

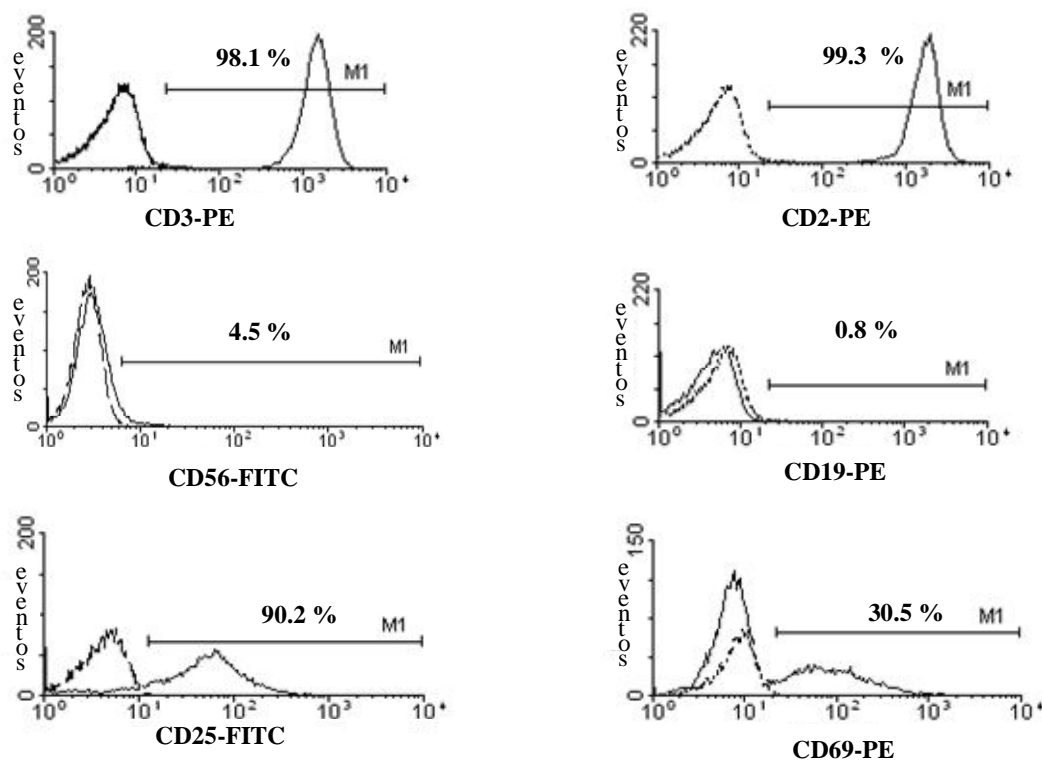


Figura 13.- Análisis fenotípico de células T expandidas a partir de PBMC humanas mediante tratamiento con PHA e IL-2. Linfocitos T expandidos con PHA e IL2 fueron marcados con anticuerpos frente a marcadores de: linfocitos T (CD₃, CD₂), linfocitos NK (CD₅₆) y linfocitos B (CD₁₉), así como marcadores de activación de células T (CD₂₅, CD₆₉). Los datos mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

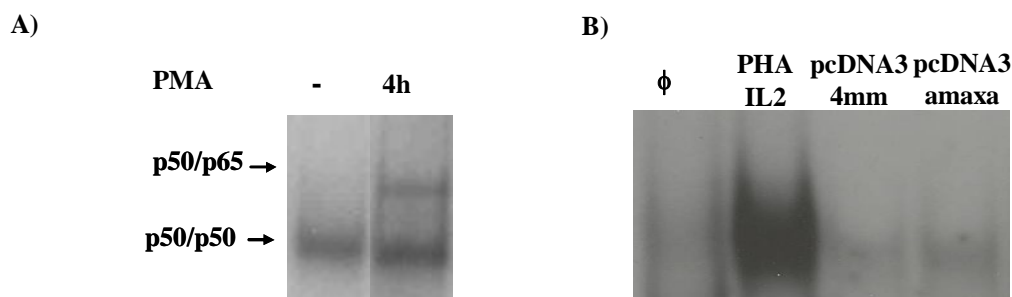


Figura 14.- Análisis de la capacidad de unión al ADN de NF- κ B en células T expandidas a partir de PBMC humanas mediante tratamiento con PHA e IL-2. Ensayo de retardo en gel de extractos de proteínas nucleares de (A) células T expandidas con PHA e IL-2, activadas o no con PMA; y (B) PBMC sin tratar, tratadas con PHA e IL2, o transfectadas mediante electroporador convencional o mediante el nucleofector de Amaxa. Se incubaron 3 μ g de proteína nuclear con una sonda marcada con [α -³²P]-dCTP que contenía un doble consenso - κ B.

Por lo tanto, las células T expandidas mediante este sistema se utilizaron en los experimentos de inmunoprecipitación y en los experimentos de unión al ADN, que se muestran en la figura 18 y en los experimentos que desarrollan el objetivo 2 de esta memoria. El resto de experimentos recogidos en este apartado 1 se llevaron a cabo en linfocitos T $CD_4^+ CD_{25}^-$ humanos purificados a partir de PBMC no activadas.

1.2.- Análisis de la distribución subcelular de $I\kappa B\alpha$ y p65/RelA en linfocitos T CD_4^+ no activados

Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que en linfocitos T CD_4^+ $I\kappa B\alpha$ se transloca al núcleo después de la activación con PMA (Laín de Lera et al., 1999). Además se ha descrito que $I\kappa B\alpha$ y p65/RelA circulan continuamente entre el núcleo y el citosol en líneas celulares no linfoides en ausencia de activación celular (Birbach et al., 2002; Huang et al., 2000). Sin embargo, este mecanismo no se ha estudiado en linfocitos T de sangre periférica no activados. Por este motivo, se analizó la circulación nucleocitosólica de $I\kappa B\alpha$ y p65/RelA en linfocitos T no activados utilizando LMB.

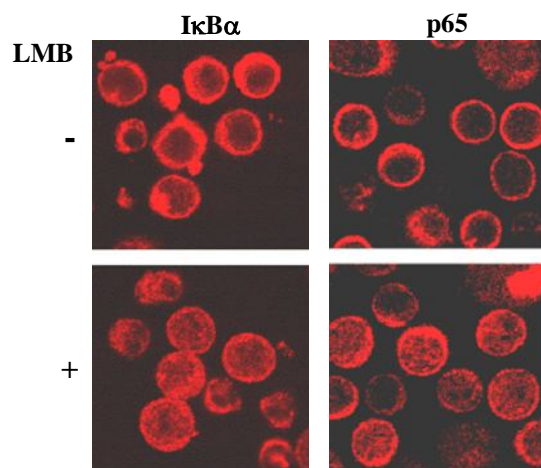


Figura 15.- Localización subcelular de $I\kappa B\alpha$ y p65/RelA en linfocitos T CD_4^+ . Las células fueron tratadas o no tratadas con LMB, fijadas, permeabilizadas y teñidas con anticuerpos específicos frente a $I\kappa B\alpha$ y p65/RelA. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con Texas-Red. Las imágenes se adquirieron mediante microscopía confocal.

En primer lugar, se analizó la distribución subcelular de $I\kappa B\alpha$ y de p65/RelA mediante microscopía confocal. Tanto $I\kappa B\alpha$ como p65/RelA se localizaron en el citoplasma de estas células T no activadas (Fig. 15). Después del tratamiento con LMB durante 4 horas, $I\kappa B\alpha$ y p65/RelA quedaban retenidas en el núcleo. Esta translocación

nuclear se observó en ausencia de cualquier estímulo y no fue debido a la activación por componentes del suero porque resultados similares se observaron tras la deprivación del suero del medio de cultivo (datos no mostrados).

Estos resultados se confirmaron utilizando proteínas quiméricas formadas por la proteína YFP fusionada con $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (EYFP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$) o con p65/RelA (EYFP-p65). Para ello, linfocitos T CD_4^+ se transfectaron transitoriamente con los vectores de expresión de estas proteínas (pEYFP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y pEYFP-p65) por separado. Veinticuatro horas después de la transfección las células se trataron con LMB y se analizaron mediante microscopia confocal. Las proteínas de fusión EYFP-p65 y EYFP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, que tenían una localización principalmente citosólica en células no estimuladas, quedaron retenidas en el núcleo tras el tratamiento con LMB en ausencia de activación (Fig. 16). Para descartar que la localización de las proteínas quiméricas pudiera ser inespecífica se utilizó como control un vector de expresión de la proteína YFP bajo el control del promotor del CMV (CMV-pEYFP). La proteína YFP, que carece de secuencias NLS y NES, se distribuyó homogéneamente por toda la célula, con independencia del tratamiento con LMB.

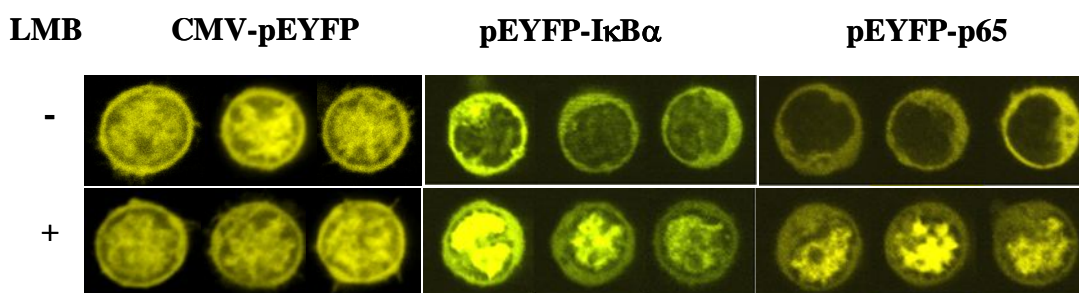


Figura 16.- Localización subcelular de las proteínas de fusión EYFP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y EYFP-p65 en linfocitos T CD_4^+ . A) Las células se transfectaron transitoriamente con 1 μg del vector de expresión pEYFP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ o pEYFP-p65 por millón de células. Tras el tratamiento con LMB las células se analizaron mediante microscopia confocal. El plásmido CMV-pEYFP se utilizó como control de distribución inespecífica.

Utilizando las proteínas de fusión EYFP-p65 y EYFP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ se estudió también la dinámica de la circulación núcleo-citoplásmica de $\text{NF}\kappa\text{B}/\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en células vivas. Linfocitos T CD_4^+ transfectados con el vector pEYFP- $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ se analizaron mediante microscopía confocal, tomando fotografías cada 90 segundos antes y durante el tratamiento con LMB. Tras varios ensayos, el tiempo medio necesario para que el núcleo del linfocito quedase saturado con $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ fue de seis minutos. La figura 17 muestra imágenes tomadas de esta grabación *in vivo*.

La toxicidad relacionada con la dosis de LMB utilizada (20nM) (Hamamoto et al., 1983; Matsuyama et al., 2006) se analizó tras 24 horas de tratamiento mediante tinción con ioduro de propidio y la mortalidad no superó el 10% (datos no mostrados).

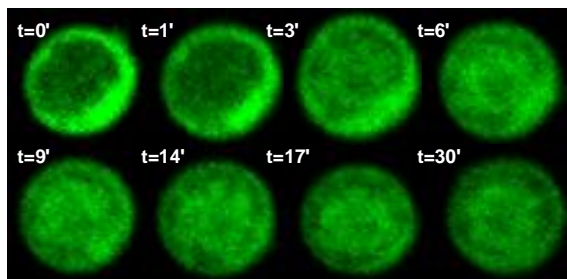


Figura 17.- Análisis de la cinética de translocación nuclear de $I\kappa B\alpha$ en células T vivas. Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de un linfocito T $CD4^+$ transfectado con el plásmido pEYFP- $I\kappa B\alpha$ antes y después del tratamiento con LMB (20nM).

1.3.- Caracterización de las interacciones entre p65/RelA e $I\kappa B\alpha$ en linfocitos T no activados

Para determinar si p65/RelA e $I\kappa B\alpha$ se encontraban en el núcleo de linfocitos T no activados, extractos de proteínas nucleares y citosólicas se analizaron mediante ensayos de *western-blot* utilizando anticuerpos específicos. Estos experimentos, así como el estudio de la capacidad de unión de NF- κ B al ADN se realizaron en células T obtenidas a partir de PBMC y expandidas según el protocolo descrito en el apartado 1.1. Tras el tratamiento con LMB, se indujo un incremento de p65/RelA e $I\kappa B\alpha$ principalmente en el núcleo, mientras que no había diferencias significativas en la concentración citosólica de estas proteínas (Fig. 18A). Cuando estas células T fueron activadas con PMA, la cantidad de $I\kappa B\alpha$ nuclear disminuyó, respecto a los niveles de p65/RelA (Fig. 18A, núcleo, carril 3). Con estos mismos extractos de proteínas nucleares se realizaron ensayos de inmunoprecipitación utilizando un anticuerpo frente a p65/RelA. Los complejos NF- κ B/ $I\kappa B\alpha$ se detectaron en el núcleo de células T no activadas, tratadas o no con LMB (Fig. 18A), pero no fueron detectados en el núcleo de las células activadas con PMA.

Una vez confirmado que tanto p65/RelA como $I\kappa B\alpha$ eran capaces de circular entre el núcleo y el citoplasma en células T en ausencia de activación, la capacidad de unión de NF- κ B al ADN se analizó mediante ensayos de retardo en gel. A pesar de que

en el núcleo de las células T no activadas se observó la presencia de p65/RelA por *western-blot*, no se detectó unión a la sonda - κ B, ni siquiera en presencia de LMB (Fig. 18B, carriles 1 y 2). Esto concuerda con la presencia de complejos de NF κ B e I κ B α detectados en el núcleo de estas células mediante inmunoprecipitación con anti-p65/RelA (Figura 18A, núcleo, carriles 1 y 2). Sin embargo, NF- κ B sí interaccionó con los motivos consenso - κ B en el ADN después de la activación con PMA (Fig. 18B, carril 3). Este hecho correlaciona con la ausencia de complejos NF κ B/I κ B α en el núcleo de células T activadas con PMA (Figura 18A, núcleo, carril 3).

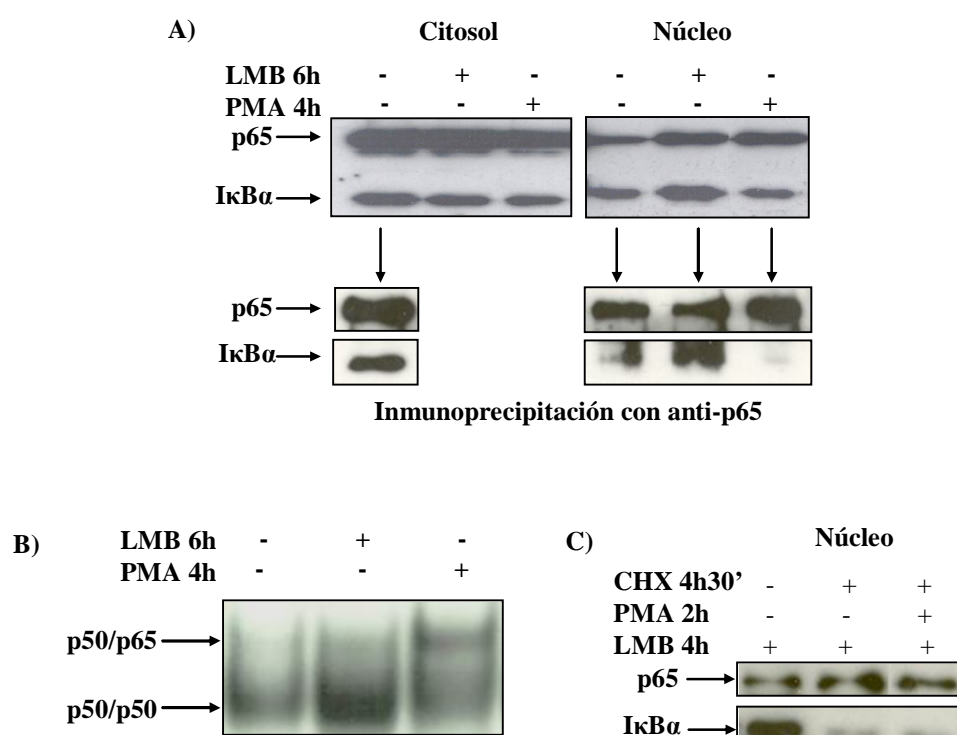


Figura 18.- Análisis de la distribución subcelular de los complejos NF- κ B/I κ B α en linfocitos T CD $_4^+$ y de la dependencia de los niveles I κ B α de la síntesis *de novo* de proteínas. A) Análisis de la distribución subcelular de p65/RelA e I κ B α en linfocitos T CD $_4^+$ y de la presencia de complejos NF- κ B/I κ B α en el núcleo después del tratamiento con LMB o PMA. Diez μ g de extractos de proteínas citosólicas y nucleares obtenidos de linfocitos T CD $_4^+$ tratados con PMA o LMB durante 4 y 6 horas respectivamente se analizaron mediante *western-blot* utilizando anticuerpos frente a p65/RelA e I κ B α . Los ensayos de inmunoprecipitación se realizaron con 100 μ g de estos extractos de proteínas citosólicas y nucleares. B) Análisis de la capacidad de unión al ADN de NF- κ B mediante un ensayo de retardo en gel en linfocitos T CD $_4^+$ tratados con LMB o PMA. Tres μ g de extractos de proteínas nucleares se incubaron con una sonda marcada con [α - 32 P]-dCTP que contiene el doble consenso - κ B del LTR del VIH. C) Análisis de la dependencia de los niveles de I κ B α de la síntesis *de novo*. Diez μ g de extractos de proteínas nucleares se incubaron con LMB durante 4 horas y CHX y/o PMA durante 4 horas y 30 minutos o 2 horas respectivamente y se analizaron por *western-blot*.

Para bloquear la síntesis de proteínas, las células T se trataron con CHX durante 30 minutos antes de la adición de cualquier otro estímulo. Después del tratamiento con CHX se añadió LMB y/o PMA al medio de cultivo y los estímulos se mantuvieron durante 4 horas y 2 horas, respectivamente. Los extractos de proteínas nucleares obtenidos se analizaron mediante ensayos de *western-blot*. Se observó una disminución de la cantidad de IκBα en el núcleo de células T tratadas simultáneamente con CHX y LMB (Fig. 18C, carril 2) o con CHX, LMB y PMA (Fig. 18C, carril 3) respecto a las células T tratadas únicamente con LMB, lo que sugiere que el mantenimiento de los niveles de IκBα es dependiente de una síntesis continuada de la proteína.

1.4.- Caracterización funcional de la actividad basal de NF-κB en linfocitos T CD₄⁺

El siguiente objetivo fue determinar la capacidad de IκBα para disminuir la actividad transcripcional de NF-κB y analizar su influencia sobre la replicación del VIH-1. Con este propósito, linfocitos T CD₄⁺ se transfectaron de forma transitoria con un vector que contiene el gen de la luciferasa bajo el control del promotor LTR del VIH (LTR-LUC), sólo o conjuntamente con un vector de expresión de la proteína viral Tat (CMV-Tat). La actividad transcripcional de NF-κB se evaluó midiendo la actividad luciferasa en estas células. Se observó que la actividad basal de NF-κB detectada se incrementó después de la sobreexpresión de Tat en ausencia de estímulos (Fig. 19A y 19B, Basal, barras 1 y 3). La activación con PMA potenció la actividad de NF-κB tanto de forma aislada como en presencia de Tat (Fig. 19A y 19B, PMA, barras 1 y 3), tal y como se ha descrito previamente (Alcamí y col., 1995; Beauparlant y col., 1996; Laspia y col., 1990). Sin embargo, cuando los niveles de IκBα nuclear se incrementaron bien por medio del tratamiento con LMB (Fig. 19A) o bien mediante la transfección transitoria de un vector de expresión de IκBα (CMV- IκBα) (Fig.19B), se produjo un acusado descenso en la actividad de NF-κB. Este descenso se observó tanto en condiciones basales de activación, como tras la sobreexpresión de Tat y/o la activación con PMA.

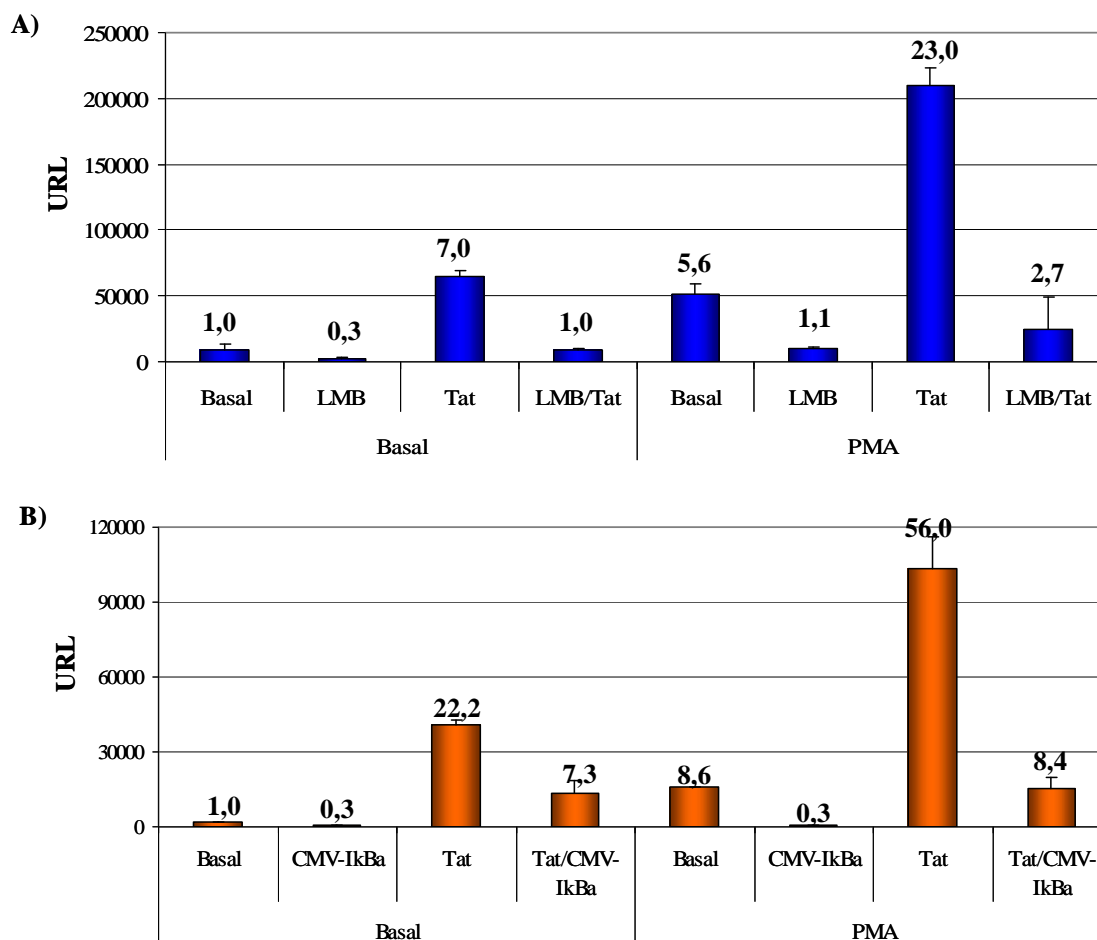


Figura 19.- Influencia de la sobreexpresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en la transactivación del LTR del VIH-1 en linfocitos T CD_4^+ . Linfocitos T CD_4^+ se transfectaron con el vector LTR-LUC junto con un vector de expresión Tat o con el vector pcDNA3.1 como control negativo. En el panel A las células se trataron con LMB inmediatamente después de la transfección y/o con PMA dos horas después de la transfección. En el panel B se co-transfectó un vector de expresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ y dos horas después las células se trataron con PMA. La actividad luciferasa se midió 18 horas después de la transfección. Los números sobre las barras indican el número de veces que se modifica la actividad transcripcional en comparación con las células no estimuladas y transfectadas con el plásmido LTR-LUC. Los datos representan medias y desviaciones estándar de tres experimentos diferentes.

Puesto que se detectó actividad basal de NF- κ B en linfocitos T CD_4^+ en ausencia de activación, se intentó determinar, por un lado, si esta actividad de NF- κ B era suficiente para activar la replicación del VIH-1 y por otro lado, cual era la influencia de la sobreexpresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ en la replicación del virus. Linfocitos T CD_4^+ , purificados a partir de sangre donantes sanos (CD_4^+ , CD_{25}^- , CD_{69}^- , DR^-), se transfectaron con el plásmido pNL 4.3, que contiene el genoma completo del VIH-1, junto con un vector de expresión de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ o con el vector pcDNA3.1 como control negativo. Las células se mantuvieron en cultivo durante 7 días, en ausencia de activación o en presencia de PHA e IL-2 o anti-CD3 e IL-2. La replicación del VIH-1 se evaluó en los días 5º y 7º post-transfección midiendo la producción de p24 en el sobrenadante de los cultivos.

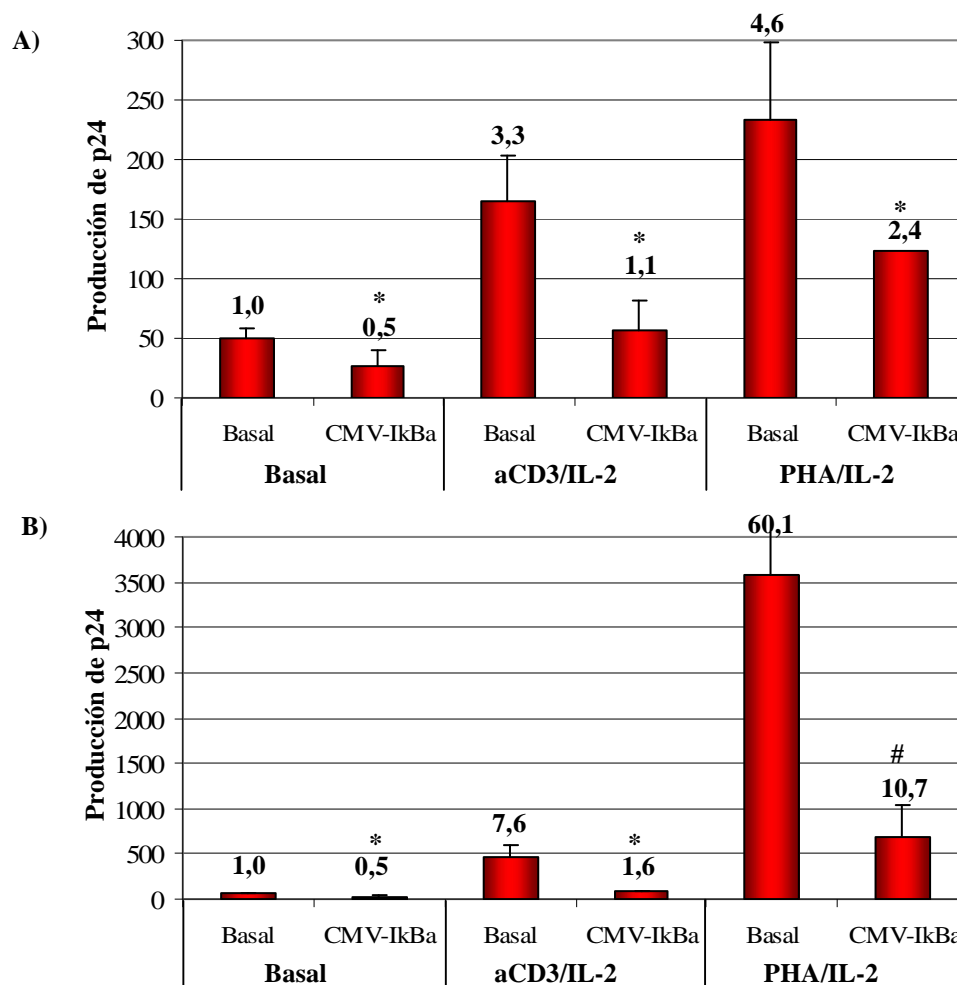


Figura 20.- Replicación del VIH-1 en linfocitos T CD_4^+ en situación basal o activados. Linfocitos T CD_4^+ purificados se transfectaron con el clon viral pNL4.3 junto con el vector CMV-IkBa o pcDNA3.1 como control. A continuación se activaron con anti-CD3 e IL-2, PHA e IL-2 o se mantuvieron en ausencia de activación. La replicación viral se determinó mediante cuantificación de p24 en los sobrenadantes del cultivo a los 5 días (A) y 7 días (B) tras la transfección. Los números sobre las barras indican el número de veces que se modifica la replicación relativa del VIH en comparación con las células no estimuladas y transfectadas con el plásmido pNL4.3. Los símbolos “*” y “#” indican respectivamente que las diferencias en la producción de p24 fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) o con tendencia hacia la significación estadística ($p = 0.081$), mediante el test de Mann-Whitney.

Se observó que, en aquellas células en las que se sobreexpresó IkBa, la producción de p24 disminuyó entre 2 y 3 veces después de 5 días en cultivo (Fig. 20A) y entre 4 y 6 veces después de 7 días en cultivo (Fig. 20B), en comparación con aquellas células que se co-transfectaron con un plásmido control. Además se observó producción de p24 los días 5° y 7° después de la infección en linfocitos T CD_4^+ no estimulados. La sobreexpresión de IkBa disminuyó a la mitad la replicación viral en los linfocitos T CD_4^+ en ausencia de estimulación.

La disminución en la producción de p24 obtenida tras la sobreexpresión de I κ B α el día 7^o post-transfección fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$, test de Mann-Whitney) en las células T CD $_4^+$ no activadas y en las tratadas con anti-CD3 e IL-2. En los cultivos tratados con PHA se observó una tendencia, aunque no se alcanzó la significación estadística ($p = 0.081$) (Fig. 19B).

2.- ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL VIH-1 A TRAVÉS DE LA ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR TLR2 EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA

2.1.- Análisis de la expresión de TLR2 inducida por PGN en células T

Las células T se obtuvieron según el protocolo de expansión de células T tratadas con PHA e IL-2 descrito previamente en el punto 1.1. Estas células se cultivaron en ausencia de IL-2 durante 18 horas y a continuación se trataron con PGN a diferentes tiempos. Se realizó entonces el aislamiento del ARN total y se analizó la expresión de ARNm de TLR2 mediante un ensayo de RT-PCR semicuantitativa y posterior análisis densitométrico. Tras el tratamiento con PGN, la expresión de ARNm de TLR2 aumentó en torno a dos veces después de 4 y 24 horas de tratamiento (Fig. 21).

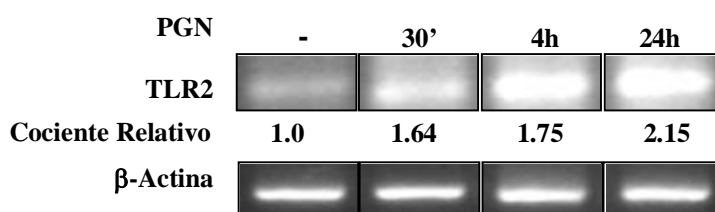


Figura 21.- Expresión de ARNm de TLR2 en células T tratadas con PGN. La expresión de ARNm de TLR2 se analizó tras el tratamiento con PGN durante 30 minutos, 4 horas o 24 horas. El cociente relativo indica la expresión de ARNm de TLR2 comparada con la expresión en células T no tratadas con PGN. Los datos se normalizaron con respecto a los niveles de expresión de β -actina.

A continuación, se analizó la expresión basal de TLR2 en la superficie de células T CD $_3^+$ mediante citometría de flujo. La tinción intracitoplasmática mostró que el 83% de las células T CD $_3^+$ expresaban TLR2 en condiciones basales (Fig. 22A). Sin embargo, sólo el 3% de estas células T CD $_3^+$ expresaban TLR2 en su superficie en ausencia de activación (Fig. 22B). Tras el tratamiento con PGN durante 30 minutos, la

expresión de TLR2 aumentó hasta 7,5 veces. Este incremento en la expresión se mantuvo tras 4 horas de tratamiento y retornó a los valores basales a las 24 horas.

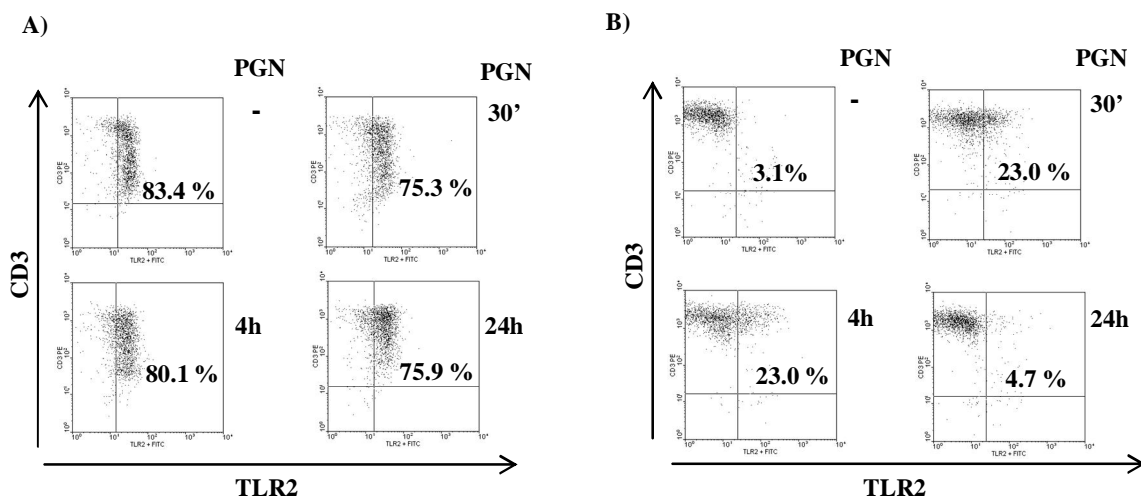


Figura 22.- Expresión de TLR2 en células T tratadas con PGN. La expresión de TLR2 A) intracelular y B) en superficie se analizó mediante citometría de flujo en células T CD_3^+ tratadas con PGN (60 μ g/ml) durante 30 minutos, 4 horas o 24 horas. Los datos mostrados son representativos de tres experimentos.

Con el fin de conocer qué subpoblación de linfocitos T formaban la población que expresaban TLR2 en superficie, se analizó la expresión de CD_4 junto con la de TLR2 en linfocitos T CD_3^+ tratados con PGN durante 30 minutos. El análisis mediante citometría de flujo mostró que la mayoría de las células T CD_3^+ (18%) que expresaban TLR2 en su superficie eran linfocitos CD_4^+ (15%) (Fig. 23).

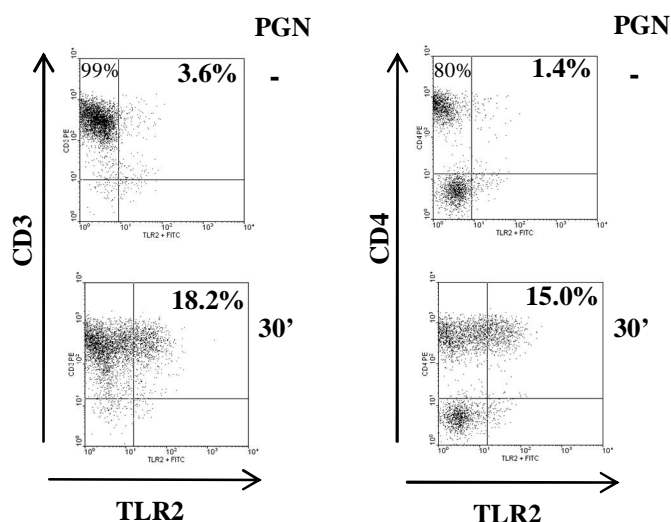


Figura 23.- Caracterización del subtipo de células T CD_3^+ que expresan TLR2. La expresión de TLR2 se analizó mediante citometría de flujo en la superficie de células T CD_3^+ y T CD_4^+ antes y después del tratamiento con PGN durante 30 minutos.

2.2.- Influencia del tratamiento con PGN sobre la activación de NF- κ B en células T

Para determinar la localización subcelular de p65/RelA las células T se transfectaron transitoriamente con un vector de expresión de la proteína quimérica EYFP-p65 (pEYFP-p65) y, 18 horas después, se trataron con PGN durante distintos tiempos. El análisis mediante microscopía confocal mostró que la proteína EYFP-p65 se acumuló progresivamente en el núcleo conforme aumentaba el tiempo del tratamiento con el PGN (Fig. 24). La distribución subcelular inespecífica de la proteína YFP se estudió utilizando el plásmido control CMV-pEYFP.

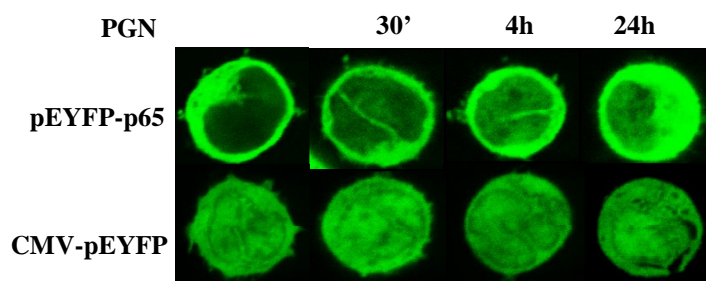


Figura 24.- Análisis de la localización subcelular de la proteína EYFP-p65 en células T tratadas con PGN. La localización subcelular de la proteína EYFP-p65 se analizó mediante microscopía confocal en células T transfectadas transitoriamente con el vector pEYFP-p65. El plásmido CMV-pEYFP se utilizó como control de distribución inespecífica.

Con el objetivo de confirmar la translocación nuclear de p65/RelA mediada a través de la estimulación del TLR2, extractos de proteínas obtenidos de células T tratadas con PGN se analizaron mediante *western-blot*. La expresión de p65/RelA se mantuvo sin cambios tras el tratamiento con PGN durante 30 minutos, pero aumentó ligeramente tras 4 y 24 horas de tratamiento tanto en el citoplasma como en el núcleo (Fig. 25A y B, p65/RelA, carriles 3 y 4). Acorde con la activación de NF- κ B, después del tratamiento con PGN también se observó la degradación de su principal inhibidor I κ B α (Fig. 25A y B, I κ B α , carriles 3 y 4). Debido a que la principal modificación postraduccional de p65/RelA responsable de su actividad transcripcional es la fosforilación en la Ser⁵³⁶ (Sakurai et al., 1999), se estudió mediante *western-blot* si la proteína p65/RelA acumulaba en el núcleo tras el tratamiento con PGN estaba fosforilada en la Ser⁵³⁶. Esta forma transcripcionalmente activa de p65/RelA era

prácticamente inexistente en el núcleo de células T no estimuladas, pero aumentó tras el tratamiento con PGN durante 4 horas y 24 horas (Fig. 25B, fosfo-p65, carriles 3 y 4).

A continuación, se analizó la actividad de unión al ADN de NF- κ B en los extractos de proteínas nucleares mediante un ensayo de retardo en gel. En las células T no tratadas se observó unión al ADN de los complejos p50/p50 pero no de los heterodímeros p50/p65 transcripcionalmente activos (Fig. 25C, carril 1). Sin embargo, tras el tratamiento con PGN durante 4 y 24 horas, se indujo la unión del complejo p50/p65 a los motivos - κ B de la sonda (Fig. 25C, carriles 3 y 4). La capacidad transactivadora del factor NF- κ B inducida por el tratamiento con PGN se analizó también mediante la transfección del vector 3- κ B-LUC, que contiene el gen de la luciferasa bajo el control de tres secuencias - κ B. La actividad luciferasa aumentó 3 veces en las células tratadas con PGN en comparación con las no tratadas (Fig. 25D).

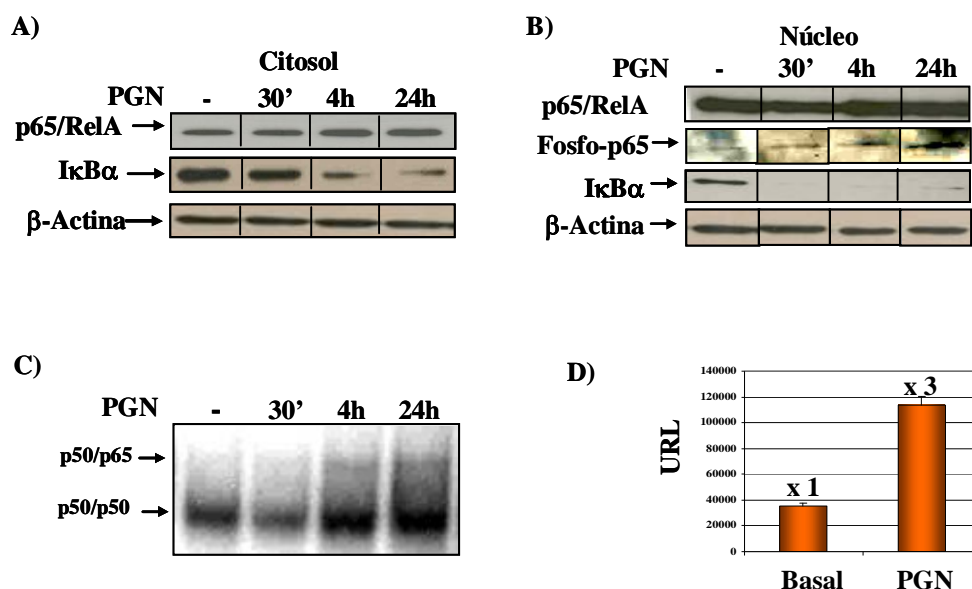


Figura 25.- Activación de NF- κ B en células T tratadas con PGN. Extractos de proteínas (A) citosólicas y (B) nucleares obtenidos de células T tratadas o no con PGN se analizaron mediante *western-blot* utilizando anticuerpos específicos frente a p65/RelA e IκBα. La proteína β-actina se utilizó como control de carga. C) Ensayo de retardo en gel de extractos de células T tratadas o no con PGN. Tres μg de extractos de proteína nuclear se incubaron con una sonda marcada con [α - 32 P]-dCTP que contiene los consensos - κ B del LTR del VIH-1. D) Actividad luciferasa en células T transfectadas con el plásmido 3- κ B-LUC tratadas con PGN inmediatamente después de la transfección. Los números encima de las barras indican el número de veces que se modificó la actividad transcripcional relativa en comparación con las células no tratadas. Los datos mostrados son la media y la desviación estándar de tres experimentos.

2.3.- Análisis de la influencia de la activación con PGN en la transactivación del LTR del VIH-1 y en la replicación viral en linfocitos T

Las células T se transfectaron transitoriamente con el vector LTR-LUC y fueron inmediatamente estimuladas con PGN (Fig. 26A). La transactivación del promotor LTR del VIH se evaluó midiendo la expresión de luciferasa en los extractos proteicos obtenidos 18 horas después de la transfección. Las URL se incrementaron 2,4 veces en las células tratadas con PGN en comparación con las no tratadas.

Puesto que el tratamiento con PGN activó la transactivación del promotor LTR del VIH-1, se analizó si este estímulo también incrementaba la replicación del VIH-1. Para ello, se evaluó la producción de virus en células T infectadas con el virus NL4.3-Renilla y tratadas con PGN durante 48 y 72 horas.

Los resultados se compararon con los obtenidos tras la activación del receptor de la célula T con un anticuerpo frente a CD₃. La replicación del VIH-1 se cuantificó midiendo la actividad Renilla en los lisados celulares. Se observó que la replicación del VIH-1 aumentaba más de 4 veces en las células T tratadas con PGN durante 48 horas, en comparación con las células T no tratadas. Este aumento se mantuvo hasta 2 veces tras el tratamiento con PGN durante 72 horas (Fig. 26B). La replicación del VIH-1 también se evaluó midiendo la producción del antígeno p24 en los sobrenadantes de las células T a las 48 y 72 horas de infección. La producción de p24 aumentó hasta 5 veces tras el tratamiento con PGN durante 48 horas y este incremento se mantuvo después de 72 horas de tratamiento (Fig. 26C).

Los incrementos de la producción de p24 y de la actividad Renilla fueron estadísticamente significativos ($p < 0.001$, test de Mann-Whitney) en las células T tratadas con PGN en comparación con las células no tratadas, a las 48 y 72 horas de infección.

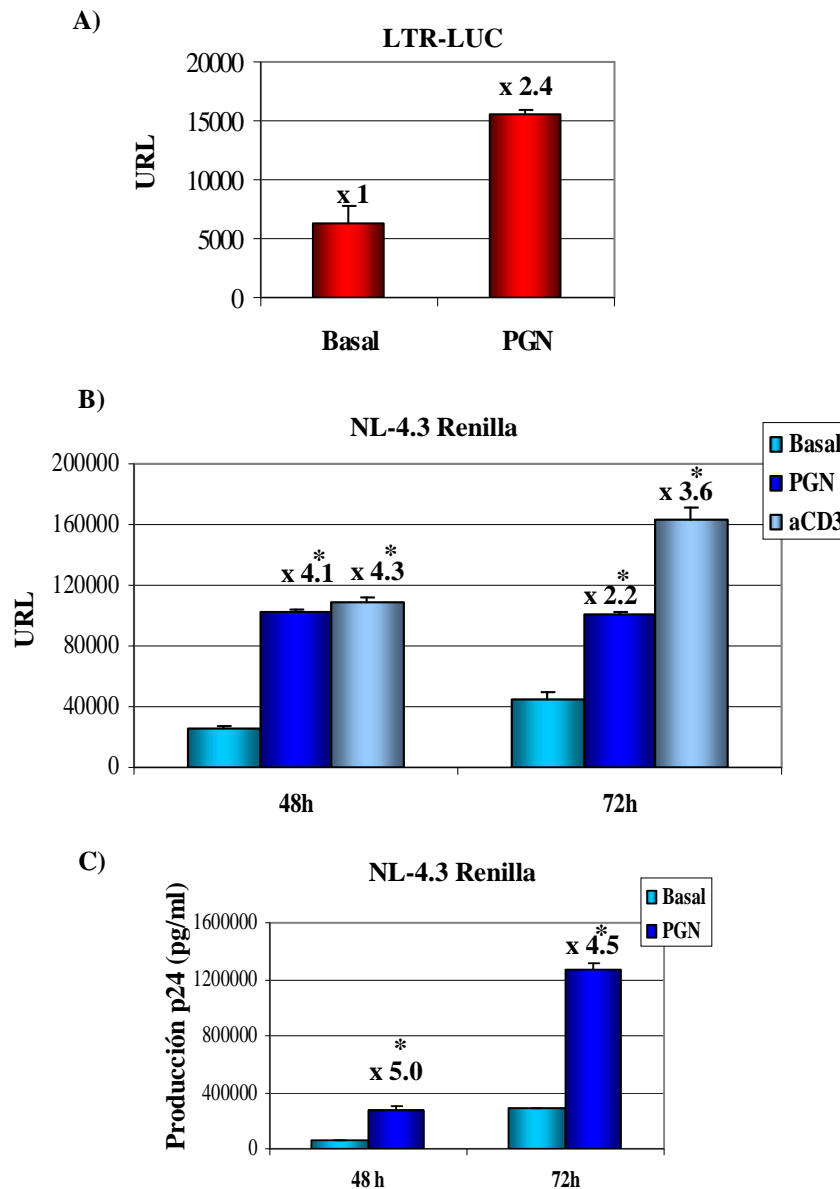


Figura 26.- Transactivación del LTR del VIH-1 y replicación viral en células T estimuladas con PGN. A) Actividad luciferasa en células T transfectadas con el plásmido LTR-LUC y tratadas con PGN (60µg/ml) inmediatamente después de la transfección. Las URL se midieron 18 horas después de la transfección. La replicación del VIH-1 en células T tratadas o no con PGN inmediatamente después de la infección con el clon viral NL4.3-Renilla se evaluó midiendo (B) URL y (C) producción p24 a las 48 y 72 horas de infección. El símbolo “*” indica que las diferencias eran estadísticamente significativas en células tratadas frente a las no tratadas para un mismo tiempo de tratamiento (test de Mann-Whitney). Los números sobre las barras indican el número de veces que se modifica la actividad transcripcional relativa en comparación con las células no tratadas. Los datos mostrados representan la media y la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

3.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES FUNCIONALES INDUCIDAS POR LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA Tat DEL VIH-1 EN CÉLULAS JURKAT

3.1.- Generación y caracterización de células Jurkat que expresan la proteína Tat del VIH-1 constitutivamente

Las células Jurkat establemente transfectadas con la proteína Tat del VIH-1 se obtuvieron mediante el sistema de control de expresión Tet-Off (BD Biosciences Clontech). La expresión de Tat en las células Jurkat-Tat se evaluó en primer lugar mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen *tat* a partir de ARN total. Mediante esta metodología, los niveles de ARNm de Tat expresados fueron un poco inferiores a los obtenidos en células MT-2 infectadas *in vitro* con el VIH-1 (Fig. 27A).

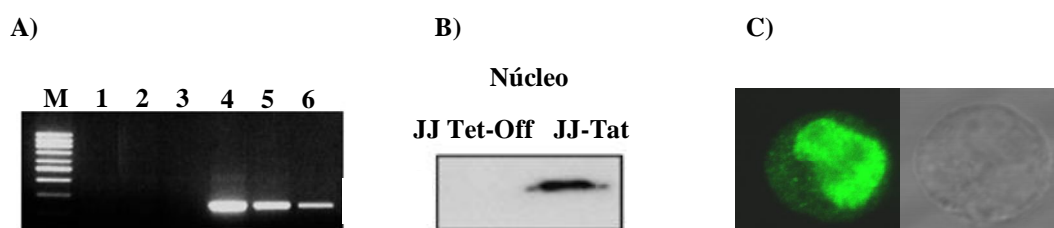


Figura 27.- Expresión y localización subcelular de Tat en las células Jurkat-Tat. A) Los niveles de ARNm del gen *tat* se analizaron mediante RT-PCR: control negativo (1), células no infectadas (2), células Tet-Off (3), células MT-2 infectadas con VIH-1 (4), vector CMV-Tat utilizado como control positivo (5) y células Jurkat-Tat (6). B) *Western-blot* de extractos nucleares utilizando un anticuerpo monoclonal específico frente a Tat (aa 1-16). C) Localización de Tat en células Jurkat-Tat fijadas, permeabilizadas y teñidas con un anticuerpo específico frente a Tat. Las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal.

Para determinar la localización subcelular de Tat, extractos de proteínas citosólicas y nucleares obtenidos a partir de células Jurkat-Tat se analizaron mediante un ensayo de *western-blot* utilizando un anticuerpo monoclonal frente a la proteína Tat. Este ensayo permitió tanto confirmar la expresión de Tat en los transfectantes estables como determinar que Tat tiene una localización preferentemente nuclear (Fig. 27B). Estos resultados se confirmaron mediante microscopía confocal. Para ello, se realizó una tinción de las células Jurkat-Tat después de su permeabilización, utilizando un anticuerpo monoclonal frente a Tat (Fig. 27C).

El siguiente paso en la caracterización de las células Jurkat-Tat fue la determinación del porcentaje de células que expresaban la proteína Tat dentro de toda la población general de transfectantes estables. Para ello, el plásmido LTR-GFP, que expresa la proteína GFP bajo el control del promotor LTR del VIH-1, se transfectó transitoriamente en las células Jurkat-Tat y la expresión de la proteína GFP se analizó mediante citometría de flujo. Las células Jurkat-Tat formaban una población mixta en la que la proteína Tat se expresó con elevada intensidad en el 36% de las células (Fig. 28).

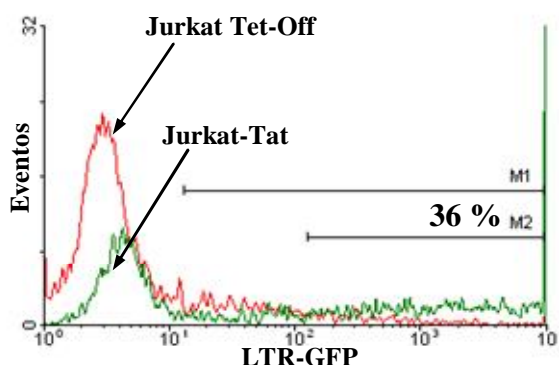


Figura 28.- Análisis del porcentaje de expresión de Tat en las células Jurkat establemente transfectadas con Tat. Células Jurkat-Tat y células Jurkat Tet-Off se transfectaron con el plásmido LTR-GFP y 18 horas después se analizó su fluorescencia mediante citometría de flujo. El porcentaje indica la cantidad de células que expresan Tat en la población.

3.1.1.- Análisis de la transactivación del LTR del VIH-1 en las células Jurkat-Tat

Se estudió la funcionalidad de Tat en las células Jurkat-Tat establemente transfectadas. Dado que se ha descrito que la proteína Tat es un potente activador del promotor LTR del VIH-1 (Brady & Kashanchi, 2005), se comprobó la actividad transcripcional de la proteína Tat en las células Jurkat-Tat transfectando transitoriamente estas células y sus controles con el plásmido LTR-LUC. La figura 16 muestra que la actividad luciferasa es 100 veces mayor en las células Jurkat-Tat que en las células Jurkat Tet-Off, utilizadas como control de la transactivación basal. Con el fin de confirmar que el incremento en la transactivación del promotor LTR se debió a la expresión de Tat, las células Jurkat-Tat se trataron con doxiciclina durante 4 días para reprimir la expresión de Tat. A continuación, se transfectaron con el plásmido LTR-LUC y se evaluó de nuevo la capacidad de transactivación del LTR del VIH-1. La actividad luciferasa disminuyó hasta alcanzar niveles similares a los obtenidos con las

células control Jurkat Tet-Off (Fig. 29). En todos los casos, la eficacia de transfección se normalizó co-transfectando un plásmido de expresión de β -galactosidasa. Por lo tanto, la proteína Tat expresada en los transfectantes estables Jurkat-Tat era funcional.

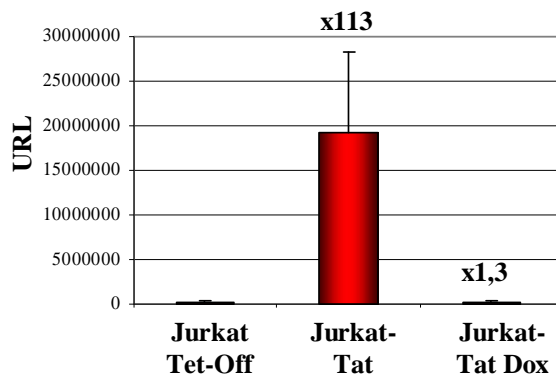


Figura 29.- Análisis de capacidad de transactivación de Tat en células Jurkat que expresan Tat constitutivamente.- Las células Jurkat Tet-Off, las células Jurkat-Tat y las células Jurkat-Tat tratadas con doxiclina se transfectaron con el plásmido LTR-LUC. Las URL se midieron 18 horas después de la transfección. El plásmido β -galactosidasa se co-transfectó para normalizar la eficacia de transfección. Los números encima de las barras indican el número de veces que se modifica la actividad transcripcional en comparación con las células Jurkat Tet-Off. Los datos mostrados corresponden a la media y a la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Tras comprobar que en las células Jurkat-Tat la transactivación del LTR del VIH-1 aumentó respecto a las células Jurkat Tet-Off se analizó la dependencia del elemento TAR y de las secuencias consenso κ B en la transactivación del LTR del VIH-1 en las células Jurkat-Tat. Con este propósito las Jurkat-Tat transfectaron con los vectores LTR-LUC, LTR- Δ TAR-LUC o LTR- Δ κ B-LUC por separado. Estos dos últimos vectores expresan el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor LTR del VIH-1 en el que se ha eliminado, respectivamente, el elemento TAR o los dos motivos consenso κ B (Fig. 30).

La actividad luciferasa mediada por el LTR tras delecinar el elemento TAR fue 120 veces menor que la actividad del LTR completo. Tat media la transactivación del LTR independientemente de TAR mediante su interacción física con diversos factores de transcripción implicados en la replicación del HIV-1 entre los que se encuentra NF- κ B. La transfección de un vector con las secuencias κ B del LTR delecionadas disminuyó aproximadamente 25 veces la transactivación del LTR, lo que muestra una sinergia entre Tat y NF- κ B en la transactivación del LTR en las células Jurkat-Tat.

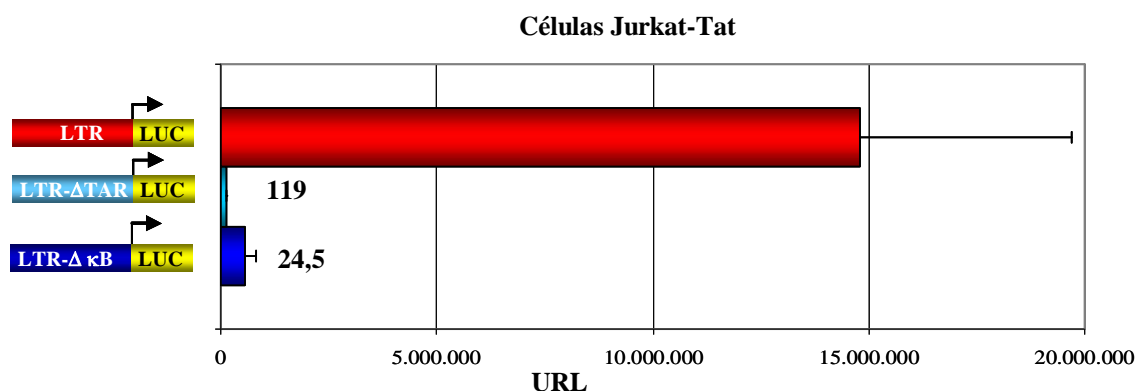


Figura 30.- Análisis de la transactivación del LTR del VIH-1 en células Jurkat-Tat. Células Jurkat-Tat se transfectaron con los plásmidos LTR-LUC, LTR-ΔTAR-LUC o LTR-ΔκB-LUC. Las URL se midieron 18 horas después de la transfección. La eficacia de transfección se normalizó co-transfectando el plásmido β-galactosidasa. Los números mostrados indican el número de veces que disminuyó la actividad transcripcional de los vectores LTR-ΔTAR-LUC o LTR-ΔκB-LUC respecto del vector LTR-LUC. Se muestran datos de la media y la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

3.1.2.- Estudio de la influencia de la expresión constitutiva de Tat en la activación de NF-κB

Los datos anteriores sugieren que en las células Jurkat-Tat existe un aumento de la actividad transcripcional de NF-κB. Para confirmar este supuesto las células Jurkat-Tat y Jurkat Tet-Off fueron transfectadas transitoriamente con el plásmido 3-κB-LUC, que expresa el gen de la luciferasa bajo tres secuencias consenso -κB (Fig. 31).

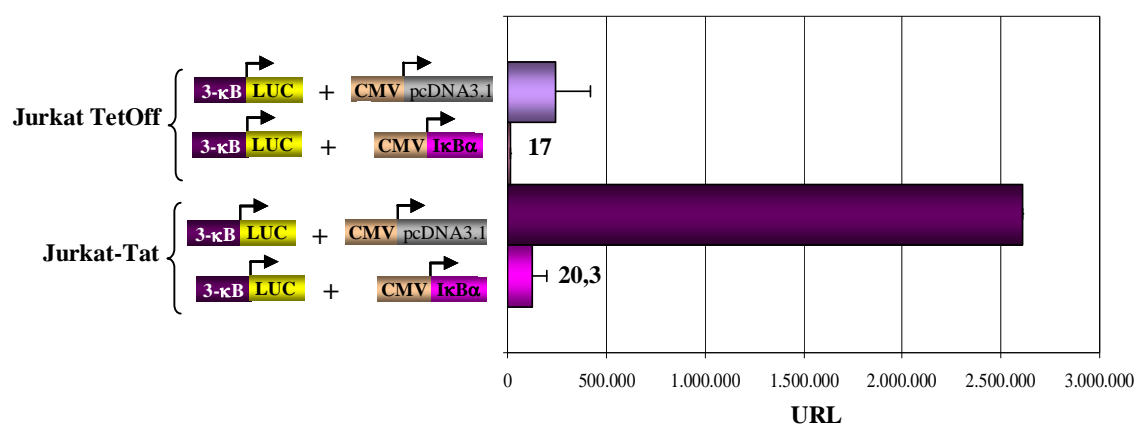


Figura 31.- Análisis de la transactivación dependiente de secuencias -κB en células Jurkat-Tat. Células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat se transfectaron con el plásmido 3-κB-LUC junto con un vector de expresión de IκBα (CMV-IκBα) o con el plásmido pcDNA3.1 como control negativo. El número mostrado indica cuantas veces se modificó la actividad transcripcional tras la sobreexpresión de IκBα en cada tipo celular. Se muestra la media y la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

La actividad luciferasa observada en las células Jurkat-Tat fue 108 veces mayor que la de las células Jurkat Tet-Off. Esta actividad fue específica de NF- κ B, ya que se inhibió en ambos tipos celulares cuando se co-transfectó un vector de expresión del inhibidor I κ B α (Fig. 31). Sin embargo en las células Jurkat-Tat la actividad luciferasa debida a la activación de NF- κ B no pudo inhibirse completamente tras la sobreexpresión de I κ B α .

Para analizar la distribución subcelular de p65/RelA, las células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat se transfectaron transitoriamente con el plásmido pEYFP-p65, se tiñeron con un anticuerpo frente a la histona H1 para delimitar el núcleo de las células y se analizaron por microscopía confocal. En comparación con las células Jurkat Tet-Off, las células Jurkat-Tat expresaron mayor cantidad de EYFP-p65, que además mostró una localización mayoritariamente nuclear, incluso en ausencia de activación (Fig. 32A). El plásmido CMV-pEYFP se utilizó como control de la distribución inespecífica de la proteína YFP (Fig. 32B). El plásmido TK-Renilla se co-transfectó como control interno de la eficacia de transfección (Fig. 32C).

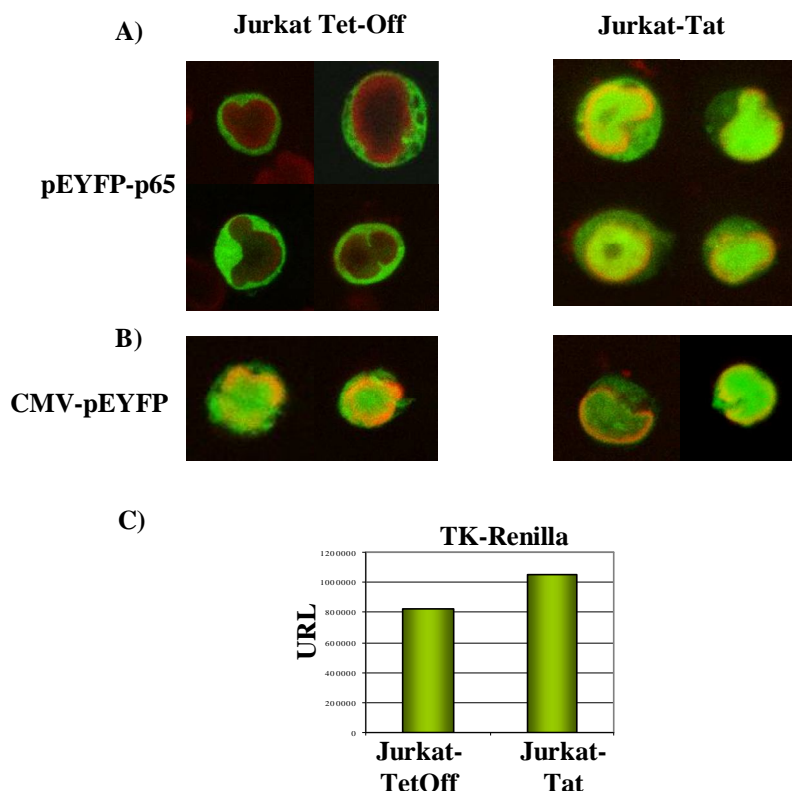


Figura 32.- Estudio de la distribución subcelular de la proteína EYFP-p65 en células Jurkat-Tat. Células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat transfectadas transitoriamente (A) con el plásmido pEYFP-p65 o (B) con el plásmido pCMV-EYFP utilizado como control de distribución inespecífica. Las células transfectadas fueron fijadas, permeabilizadas y teñidas con un anticuerpo frente histona H1. Las imágenes se adquirieron mediante microscopia confocal. C) Expresión del plásmido TK-Renilla utilizado como control de la eficacia de transfección.

Por otro lado, extractos de proteínas citosólicas y nucleares obtenidos en ausencia de estimulación a partir de células Jurkat-Tat y Jurkat Tet-Off, se analizaron mediante *western-blot* utilizando anticuerpos específicos frente a p65/RelA e I κ B α , fosforilados o no. Se observó que la cantidad de p65/RelA total, así como de p65/RelA fosforilado en la Ser⁵³⁶, estaban incrementados en las células Jurkat-Tat, tanto en el citosol (Figura 33A) como en el núcleo (Figura 33B). Se analizó asimismo la capacidad de unión de NF- κ B al ADN mediante ensayos de retardo en gel. No se detectó la unión del heterodímero transcripcionalmente activo p50/p65 en las células Jurkat Tet-Off utilizadas como control, sin embargo sí se observó su unión en el núcleo de las células Jurkat-Tat (Fig. 33C).

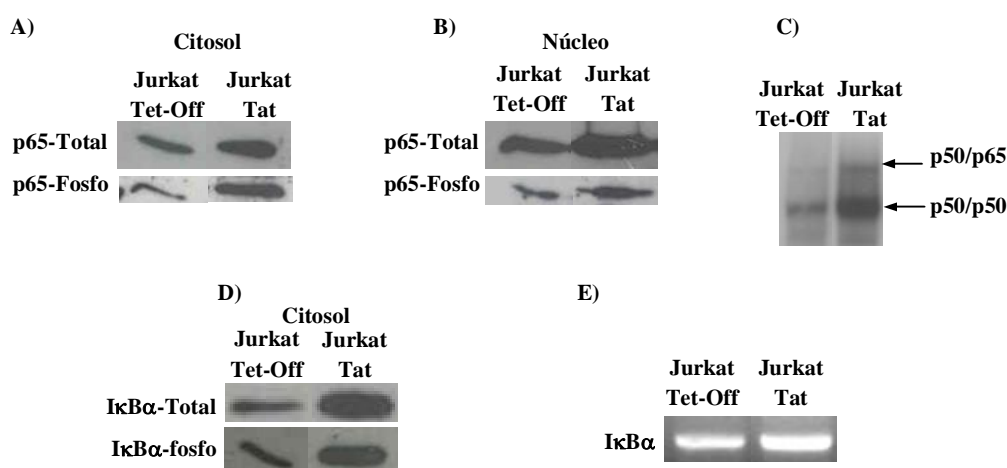


Figura 33.- Estudio de la activación de NF- κ B en células Jurkat-Tat. Extractos de proteínas citosólicas (A) y nucleares (B) obtenidos de células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat se analizaron mediante *western-blot* utilizando anticuerpos frente a p65/RelA total y fosforilado en Ser⁵³⁶. C) Ensayo de retardo en gel de extractos de células JurkatTet-Off y células Jurkat-Tat. Tres μ g de extractos de proteínas nucleares se incubaron con un oligonucleótido que contiene el doble consenso - κ B del LTR del VIH-1 marcado con [α -³²P]-dCTP. D) Extractos de proteínas citosólicas de células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat se analizaron mediante *western-blot* utilizando anticuerpos frente a I κ B α total e I κ B α fosforilado en la Ser³². E) RT-PCR para la amplificación de ARN de I κ B α de células Jurkat Tet-Off y células Jurkat-Tat.

Paralelamente, I κ B α estaba sobreexpresado en el citosol de las células Jurkat-Tat en comparación con las Jurkat Tet-Off (Fig. 33D, I κ B α). Es importante señalar que en las células Jurkat-Tat I κ B α se encontró fosforilado (Fig. 33D, I κ B α -fosfo). La resíntesis de I κ B α también se estudió mediante RT-PCR, observándose que en ausencia de activación la expresión de ARNm de I κ B α estaba incrementada en las células Jurkat-Tat en comparación con las Jurkat Tet-Off (Fig. 33E).

3.2.- Caracterización de las alteraciones funcionales inducidas por la expresión constitutiva de la proteína Tat del VIH-1 en células Jurkat

3.2.1.- Análisis de las modificaciones inducidas en el citoesqueleto por la expresión constitutiva de Tat en células Jurkat

Se ha descrito que la expresión intracelular de Tat puede activar o reprimir la expresión de genes celulares (Watson & Edwards, 1999). Por lo tanto, se analizaron las modificaciones inducidas en el proteoma de las células Jurkat que expresan Tat constitutivamente respecto a las células Jurkat Tet-Off mediante técnicas de proteómica.

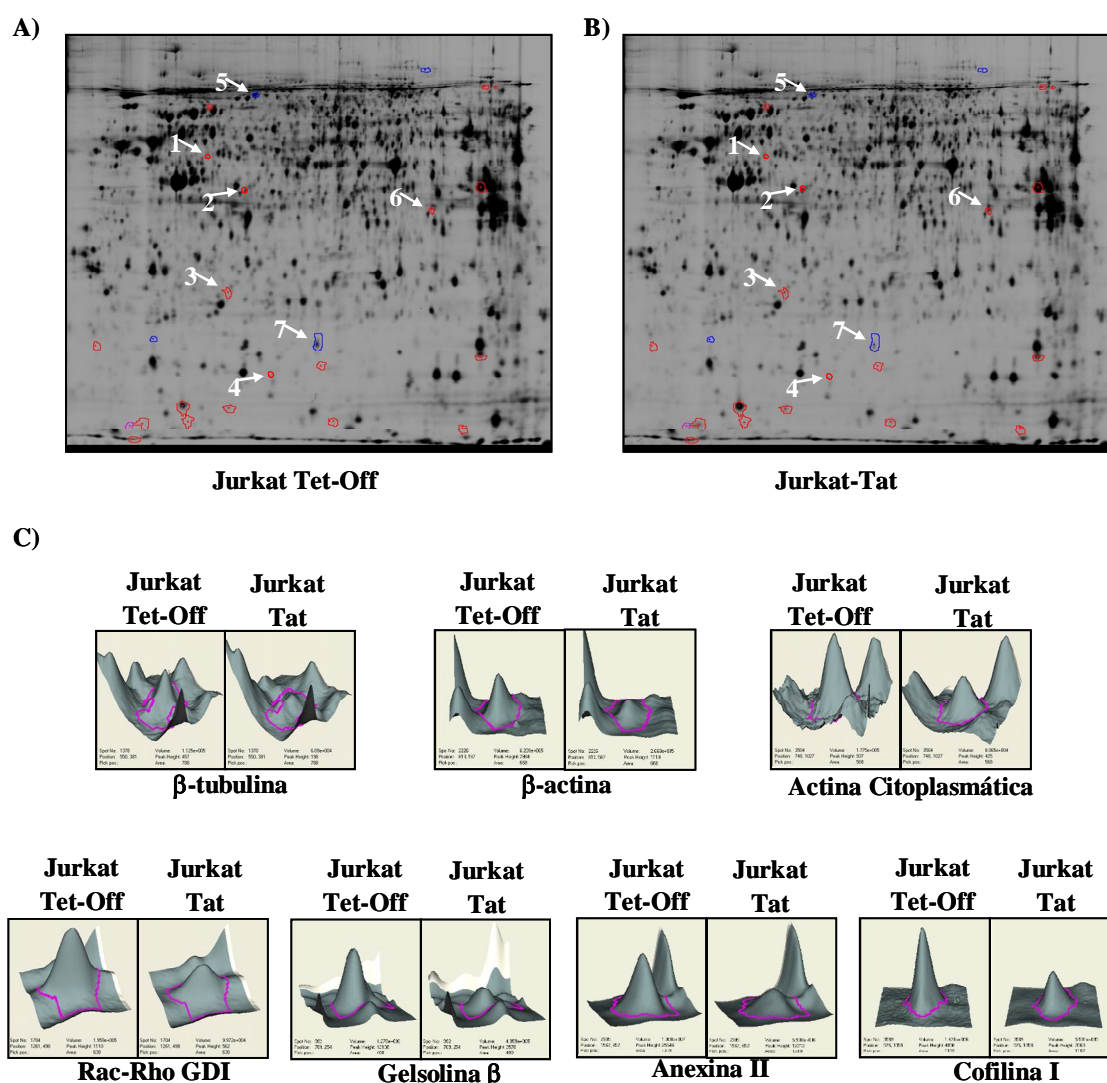


Figura 34.- Análisis de las modificaciones inducidas en la expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto por la expresión de Tat en células Jurkat. Ensayo DIGE representativo del proteoma de (A) Jurkat Tet-Off y de (B) células Jurkat-Tat. Los números de los puntos se corresponden con los de la Tabla 8. C) Representación de la expresión de proteínas asociadas al citoesqueleto que se expresan diferencialmente en las células Jurkat-Tat

Tabla 8.- Resumen de las proteínas identificadas por espectrometría de masas tipo MALDI-MS/MS que se expresan diferencialmente en las células Jurkat-Tat con respecto al control.

Nº punto	Puntuación Mascot	Código acceso	Nombre	MW (kDa)	pI	Secuencias peptídicas ^a
1	190	gi 18088719	β -tubulina	50	4.5	YLTVAAVFR IREEYPDR FPGQLNADLR LAVNMVFPFR ISEQFTAMFR FPGQLNADLRK ISVYYNEATGGK AILVDLEPGTMDSVR ALTVPELTQQVFDAK EIVHIQAGQCQNGQIGAK GHYTEGAELVDSVLDVVR
2	136	gi 49868	β -actina	39	5.8	AVFPSIVGR GYSFTTTAER PRAVFPSIVGR IWHHTFYNELR QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK
3	195	gi 52854308	Actina citoplasmática	26	5.2	IIAPPERK GYSFTTTAER QEYDESGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER
4	95	gi 9955206	Complejo Rac/Rho-GDI	21	6.2	YVQHTYR ATFMVGSYGPRPEEYELTPVE EAPK
5	242	gi 38044288	Gelsolina isoforma β	81	5.5	TGAQELLR EPGLQIWR EGGQTAPASTR YIETDPANR VVEHPEFLK AGKEPGLQIWR HVVPEVNVVQR AGALNSNDAFVLK YIETDPANRDR SEDCFILDHGKDGK EVQGFESATFLGYFK QTQVSVLPEGGETPLFK TPSAAYLWVG TGASEAEK AQPVQVAEGSEPDGFWEALGG K DPDQTDGLGLSYLSSHANVER VPFDAATLHTSTAMAAQHGM DDDG TGQK
6	93	gi 9247201	Anexina II	39	7.5	QDIAFAYQR TNQELQEINR QDIAFAYQRR SNAQRQDIAFAYQR AEDGSVIDYELIDQDAR
7	148	gi 62751777	Cofilina 1 (no muscular)	19	8.2	AVLFCLSEDKK YALYDATYETK HELQANCYEEVK HELQANCYEEVKDR

Los extractos proteicos de ambos tipos celulares se analizaron mediante un ensayo DIGE. Las figuras 34A y B muestran un ensayo DIGE representativo del proteoma de las células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat, respectivamente. Las manchas proteicas que presentaron una expresión diferencial significativa fueron digeridas y

analizadas mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-MS/MS. Las principales modificaciones en los niveles de proteínas incluyeron proteínas relacionadas con el citoesqueleto, que estaban significativamente infraexpresadas en las células Jurkat-Tat. Estas proteínas fueron β -actina, actina citosólica, β -tubulina, anexina II, gelsolina β , cofilina I y proteínas del complejo Rac/Rho-GDI (Fig. 34C y Tabla 8).

Dado que en las células Jurkat-Tat se observó una infraexpresión de proteínas del citoesqueleto, principalmente de proteínas relacionadas con el citoesqueleto de actina, sus potenciales repercusiones funcionales fueron analizadas.

En primer lugar, se analizaron las modificaciones morfológicas inducidas por la expresión constitutiva de Tat en células Jurkat. Se indujo un aumento del tamaño celular, fácilmente apreciado al observar en un microscopio confocal las células Jurkat-Tat y Jurkat Tet-Off fijadas, permeabilizadas y teñidas con un anticuerpo frente a β -actina (Fig. 35A). En segundo lugar el tamaño y la complejidad de las Jurkat-Tat y de sus controles se analizó mediante citometría de flujo. Para ello se representó en un gráfico de puntos el parámetro SSC (*side scatter*), que indica la complejidad estructural de las células, frente al parámetro FSC (*forward scatter*), que indica el tamaño de las poblaciones celulares (Fig. 35B). Un 13% de las células Jurkat-Tat mostraron una morfología más compleja y un mayor tamaño que las células Jurkat Tet-Off.

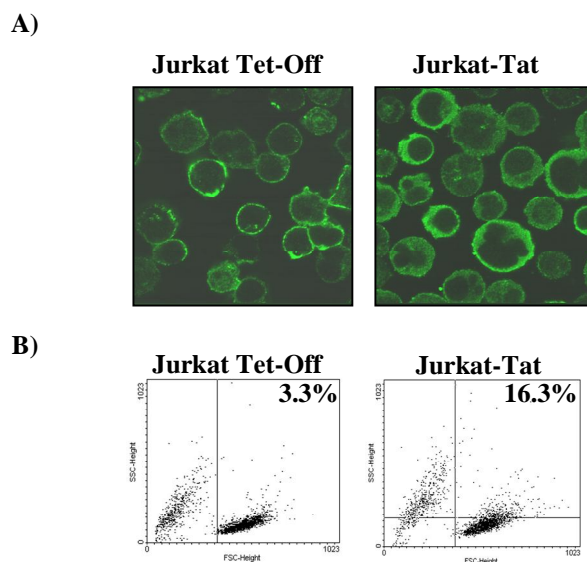


Figura 35.- Análisis de los cambios morfológicos inducidos por la expresión constitutiva de Tat en las células Jurkat. Las células Jurkat-Tat y las células Jurkat Tet-Off usadas como control se observaron en un microscopio confocal tras el marcaje con un anticuerpo frente a β -actina (A) o en un citómetro de flujo tras el marcaje con yoduro de propidio (B).

Por otro lado, se analizó si las células Jurkat-Tat mostraban alteraciones funcionales del citoesqueleto de actina. En el caso de los linfocitos, el citoesqueleto es una pieza fundamental para el mantenimiento tanto de la morfología e integridad celular como de la capacidad de migración propia de estas células. La capacidad de migración en respuesta a estímulos quimiotácticos se estudió en placas Transwell utilizando la quimiocina SDF-1 α (50nM) como quimioatrayente. La capacidad de migración en respuesta a SDF-1 α se normalizó según la migración del mismo tipo celular en ausencia de quimiocina. La migración en respuesta a SDF-1 α aumentó sólo 2 veces en las células Jurkat-Tat y casi 4 veces en las células Jurkat-Tet-Off (Fig. 36A). Sin embargo, en ausencia de SDF-1 α la migración espontánea de las células Jurkat-Tat fue ligeramente superior a la de las Jurkat Tet-Off (Fig. 36B).

La expresión en superficie de CXCR4, principal receptor de SDF-1 α , se estudió mediante citometría de flujo en las células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat. Los niveles de expresión del receptor CXCR4 fueron similares en ambos tipos celulares (Figura 36C).

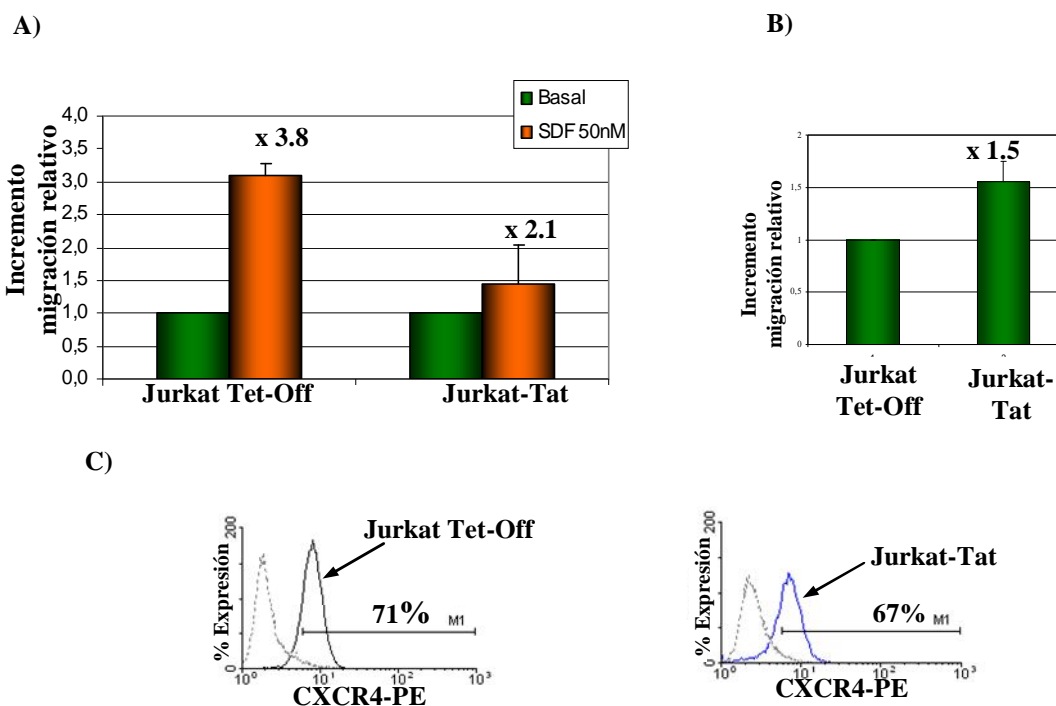


Figura 36.- Análisis de la capacidad de migración inducida por SDF-1 α en las células Jurkat-Tat. Los ensayos de quimiotaxis se realizaron en cámaras de cultivo Transwell de 5 μ m de diámetro de poro, durante 2 horas a 37°C. Las células migradas se contaron en un citómetro de flujo. A) Migración en presencia o no de SDF-1 α . El número encima de las barras indica el incremento de migración en presencia de SDF-1 α , para cada tipo celular. B) Migración en ausencia de SDF-1 α . El número encima de las barras indica el incremento de migración en las células Jurkat-Tat respecto a las células Jurkat Tet-Off. Los datos mostrados son la media y la desviación estándar de tres experimentos diferentes. C) Marcaje en superficie y análisis por citometría de flujo del receptor CXCR4. Las líneas discontinuas corresponden al control isotípico IgG2A-PE.

Un requerimiento imprescindible para que una célula inicie la migración es la previa adquisición de una morfología polarizada (Sánchez-Madrid & del Pozo, 1999). Por tanto, la capacidad de polarización en presencia de SDF-1 α fue estudiada en las células Jurkat-Tat y Jurkat Tet-Off, previamente adheridas a un cubreobjeto recubierto con fibronectina. Las células se tiñeron con un anticuerpo frente a proteínas de la familia ERM, proteínas que median la unión entre las proteínas integrales de membrana y el citoesqueleto (Charrin & Alcocer, 2006). Se adquirieron las imágenes en un microscopio confocal y se calculó el índice de polarización para cada tipo celular.

La figura 37 muestra un experimento representativo, en el que la polarización basal de las células Jurkat-Tat estaba incrementada un 41% con respecto a la de las células Jurkat Tet-Off utilizadas como controles (7%) (Fig. 37, Basal). Además, en las células Jurkat-Tat esta polarización no aumentó en presencia de un estímulo quimiotáctico, mientras que en las células Jurkat Tet-Off el índice de polarización aumentó hasta un 33% en presencia de SDF-1 α (Fig. 37, SDF-1 α).

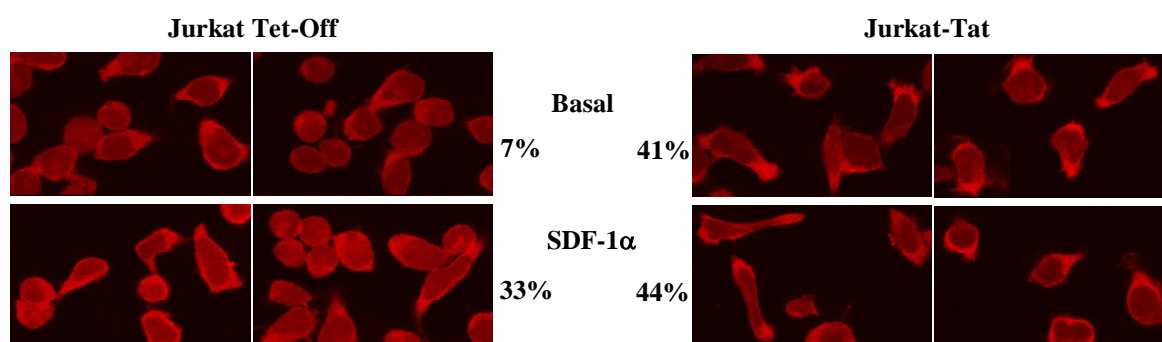


Figura 37.- Análisis de la polarización celular en células Jurkat-Tat. Las células Jurkat Tet-Off y las células Jurkat-Tat fueron tratadas o no con SDF-1 α (50nM) y se adherieron, durante 45 minutos a 37°C, a portaobjetos recubiertos con fibronectina (75 μ g/ml). Las células fijadas y permeabilizadas se tiñeron con un anticuerpo específico frente a proteínas de la familia ERM. Las imágenes se adquirieron mediante microscopia confocal. Los porcentajes indican el índice de polarización (calculado a partir de 15 campos diferentes).

Por último, se midió la polimerización de los filamentos de actina en situación basal, es decir sin utilizar ningún estímulo quimioatrayante, en células Jurkat-Tat y en Jurkat Tet-Off. Para ello se empleó faloidina, una toxina típica del hongo *Amanita phalloides* que se une a los filamentos de actina estabilizándolos (Faulstich et al., 1988; Vetter, 1998). La citometría de flujo mostró que en las células Jurkat-Tat la polimerización basal de la actina estaba aumentada un 9,5% en comparación con las células Jurkat Tet-Off (Fig. 38A). Asimismo, cuando las células Jurkat Tet-Off y Jurkat-

Tat se estimularon con SDF-1 α durante 15 segundos, la polimerización de las fibras de actina aumentó en un 8% en las Jurkat Tet-Off con relación a la polimerización en ausencia de estímulo quimioatrayente, mientras que en las células Jurkat-Tat la polimerización de actina no se modificó tras el tratamiento con SDF-1 α (Fig. 38B).

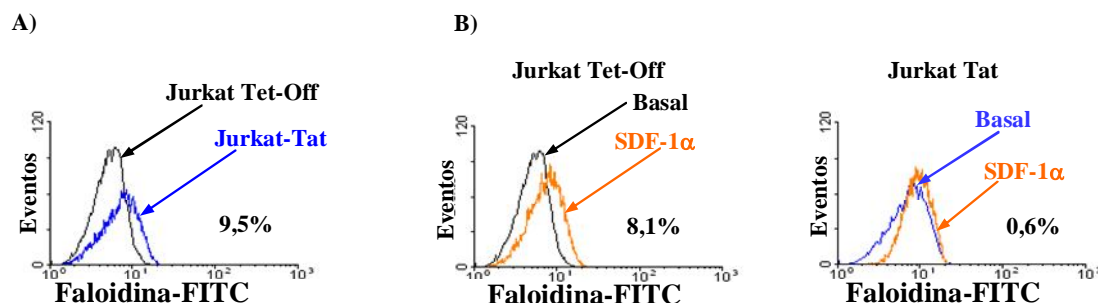


Figura 38.- Análisis de la polimerización de actina en las células Jurkat-Tat. La polimerización de actina se midió en las células Jurkat-Tat y Jurkat Tet-Off incubando con faloidina-FITC. Las células se analizaron en un citómetro de flujo. A) Polimerización de actina en ausencia de SDF-1 α . B) Polimerización de actina en presencia de SDF-1 α (50nM, 15 segundos). Los números indican el porcentaje de incremento de la polimerización de actina en las células Jurkat-Tat respecto a las células Jurkat Tet-Off, y en las células tratadas con SDF- α en comparación con las no tratadas.

3.2.2.- Análisis de la expresión constitutiva de Tat sobre la apoptosis en células Jurkat

La reorganización del citoesqueleto tiene un papel primordial en el proceso de muerte celular. Por este motivo se estudió la influencia de la expresión de Tat sobre la apoptosis inducida por diferentes estímulos en las células Jurkat-Tat y en las Jurkat Tet-Off usadas como controles. La apoptosis inducida por tunicamicina se analizó cuantificando el contenido de ADN en cada fase del ciclo celular. En ausencia de estímulo pro-apoptótico tanto células Jurkat Tet-Off como células Jurkat-Tat mostraron una fase sub-G0 similar (Fig. 39A, Control). Sin embargo, tras el tratamiento con tunicamicina a diferentes dosis (0,1 μ g/ml o 1 μ g/ml) el número de células en fase sub-G0 se incrementó mucho menos en células Jurkat-Tat (5,34% o 16%) que en células Jurkat Tet-Off (35,3% o 54.2%) (Figura 39A, Tunicamicina).

En segundo lugar, las células Jurkat Tet-Off y Jurkat-Tat se trataron con un anticuerpo monoclonal frente al receptor Fas (CD95) (20 μ g/ml) durante 2 y 4 horas. La apoptosis inducida se evaluó cuantificando la expresión de fosfatidil serina en la superficie celular, mediante el marcaje con Anexina V conjugada con FITC

(Thiagarajan & Tait, 1990). Tras el tratamiento con el anticuerpo frente a Fas, el número de células en las que se indujo apoptosis fue menor en las células Jurkat-Tat (20% y 37% a las 2 y 4 horas, respectivamente) que en las células Jurkat Tet-Off utilizadas como control (50% y 64% a las 2 y 4 horas, respectivamente) (Fig. 39B). Por lo tanto la expresión constitutiva de Tat en células Jurkat protege frente a la apoptosis inducida mediante distintos estímulos.

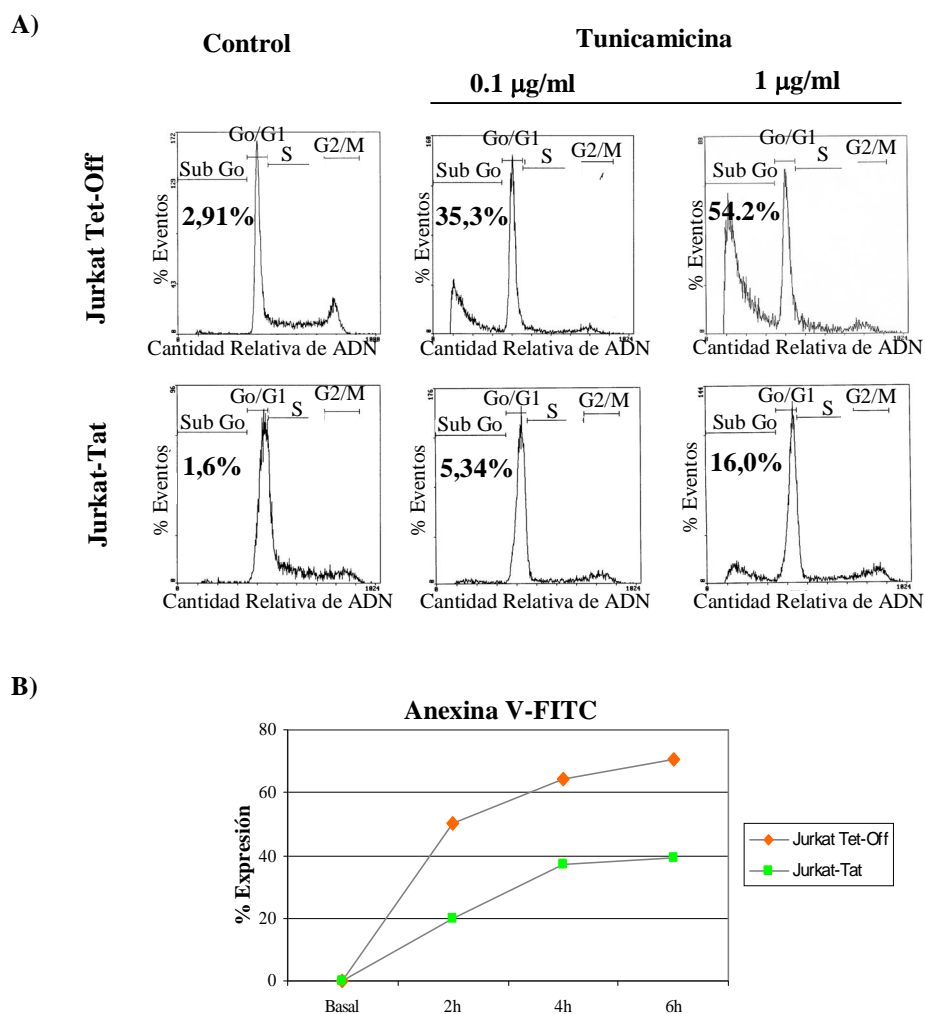


Figura 39.- Cuantificación de apoptosis en células Jurkat-Tat.- A) Análisis del ciclo celular después de la inducción de apoptosis con tunicamicina (0,1 $\mu\text{g/ml}$ y 1 $\mu\text{g/ml}$; 18 horas). Los números indican el porcentaje de células que se encuentran en fase sub-G0. B) Análisis de la expresión de Anexina V en la superficie celular después de la inducción de apoptosis con un anticuerpo frente al receptor Fas.

1.- ESTUDIO DEL TRÁFICO NÚCLEO-CITOSÓLICO DE NF- κ B/I κ B α EN LINFOCITOS T CD $_4^+$ DE SANGRE PERIFÉRICA NO ACTIVADOS Y SU IMPLICACIÓN EN LA REPLICACIÓN DEL VIH-1

Los reservorios celulares en los que el VIH-1 permanece en estado latente constituyen un obstáculo para la erradicación viral y ponen de manifiesto la necesidad de buscar nuevas dianas terapéuticas que permitan su eliminación y su control. El inicio de la transcripción del VIH-1 desde su estado de latencia en las células infectadas está controlado por la expresión de genes celulares inducidos durante los procesos de activación, principalmente NF κ B, y por la proteína viral Tat (Alcamí et al., 1995; Jeang et al., 1999; Muesing et al., 1987).

Diversos autores han confirmado la existencia de un tráfico núcleo-citosólico dinámico basal de NF κ B e I κ B α en líneas celulares no linfoides (Carlotti et al., 2000; Johnson et al., 1999). Además, nuestro grupo determinó que I κ B α se translocaba al núcleo en células T humanas activadas con PMA (Laín de Lera y col., 1999). Sin embargo, en las células T no activadas aún no se había analizado ni el tráfico nucleocitosólico de NF κ B e I κ B α ni su papel potencial en el mantenimiento de la latencia o la activación de la transcripción del VIH-1.

Los linfocitos T CD $_4^+$ son el principal tipo celular infectado por el VIH-1 y constituyen uno de los reservorios virales más importantes del organismo (Chun et al., 1995; Persaud et al., 2000). La activación celular es un requisito imprescindible para la replicación viral (Virelizier, 1990). En este contexto se pueden encontrar diferentes situaciones de expresión viral en linfocitos T CD $_4^+$ como son la latencia absoluta, cuando el virus se ha insertado en genes silentes, o la replicación viral masiva, cuando el linfocito T es activado por ejemplo mediante la estimulación del TCR. Sin embargo, entre estas dos situaciones extremas se encuentra la latencia no absoluta o relativa caracterizada por una replicación viral persistente a bajo nivel en ausencia de activación celular. De hecho se ha observado esta replicación a bajo nivel en células T no activadas (Eckstein et al., 2001; Lassen et al., 2004; Pomerantz et al., 1999; Zhang et al., 2004). A partir de estos datos hemos formulado la hipótesis de que la replicación a bajo nivel podría deberse a la activación transcripcional de NF κ B necesaria para la supervivencia celular, que a su vez sería regulada por la translocación nuclear del inhibidor I κ B α .

Con objeto de estudiar este proceso de latencia relativa era necesario disponer de células T CD₄⁺ procedentes de sangre periférica que estuvieran en un estado de reposo absoluto desde el punto de vista de NF-κB, principal factor celular implicado en la iniciación de la replicación del VIH-1. Sin embargo, la obtención de células T altamente purificadas a partir de donantes sanos conlleva dificultades técnicas (Xu et al., 2004) y una limitación en el número de células que pueden conseguirse. El protocolo de expansión aquí descrito permite obtener una población homogénea de linfocitos T CD₃⁺ suficientemente grande para obtener ARN y proteínas nucleares y citoplasmáticas de varios puntos experimentales. Aunque en un 4,5% de la población se detectó la expresión en superficie de CD₅₆, este marcador también es expresado con un frecuencia del 5% en linfocitos T CD₃⁺ (Lanier et al., 1986). Dado que CD₃ no se expresa en los linfocitos NK concluimos que la presencia de esta población es minoritaria (<2%) en los cultivos expandidos. El hecho que estos linfocitos no presenten basalmente unión de NF-κB al ADN pero ésta pueda inducirse tras la activación con PMA (Fig. 14A) convierte al sistema en una herramienta muy cómoda para estudiar el tráfico núcleo-citoplasmático de NF-κB e IκBα mediante ensayos de *western-blot* y unión al ADN. Por otro lado, la expresión en superficie de marcadores típicos de las células T activadas (Fig. 13) proporciona un contexto celular adecuado para estudiar la infección del VIH-1.

1.1.- Distribución subcelular de IκBα y p65/RelA en linfocitos T CD₄⁺ no activados

En base a las observaciones anteriores, nos planteamos la hipótesis de si NF-κB y su inhibidor IκBα se translocaban al núcleo en células T no activadas. Normalmente, en las células T no activadas el complejo p50/p65 es retenido en el citoplasma por la interacción con IκBα. La activación celular desencadena la translocación nuclear de p50/p65 y la expresión de genes dependientes de NF-κB. De acuerdo con esta hipótesis, p65/RelA e IκBα se localizaron mayoritariamente en el citoplasma (Fig. 15). Sin embargo, tras la inhibición de la exportación nuclear de proteínas con LMB se observó una acumulación rápida de p65/RelA e IκBα en el núcleo de las células T CD₄⁺, en ausencia de activación (Fig. 15 y 16). Además, utilizando la proteína EYFP-IκBα, se observó *in vivo* que, después de añadir LMB al medio de cultivo, se producía una rápida acumulación de IκBα en el núcleo de las células T CD₄⁺ que alcanzaba la saturación en menos de 6 minutos (Fig. 17).

En cuanto al estudio de la interacción entre p65/RelA e I κ B α se determinó que p65/RelA se encuentra asociado a I κ B α en el núcleo de células T no activadas (Fig. 18A) por lo que no se detectó unión al ADN de los heterodímeros p50/p65 (Fig. 18C). Sin embargo, en las células T activadas con PMA en las que no se observó unión de p65/RelA con I κ B α a pesar de la presencia de I κ B α en el núcleo (Fig. 18A), sí se detectó la unión de p50/p65 a la sonda - κ B (Fig. 18C). Estos resultados sugieren que, en linfocitos T activados, las modificaciones postraduccionales de I κ B α y/o p65/RelA reducirían la afinidad entre ambas proteínas, permitiendo la unión al ADN de heterodímeros activos de NF- κ B.

Se ha descrito que en células HeLa solamente el I κ B α de nueva síntesis es capaz de entrar en el núcleo (Arenzana-Seisdedos et al., 1995). De acuerdo con este supuesto, en las células T se observó un acusado descenso de los niveles de I κ B α nuclear tras el bloqueo de la síntesis de proteínas con CHX (Fig. 18B). Sin embargo, los niveles de p65/RelA no se modificaron, lo cual indicaría que esta proteína es más estable y tiene una vida media más larga que I κ B α , bien porque la cantidad de proteína pre-sintetizada es mayor o bien porque su degradación no es tan activa. Consiguientemente en los linfocitos T no activados I κ B α se degrada rápidamente, por lo que se requiere una resíntesis continúa para mantener constantes los niveles citoplasmáticos de I κ B α disociado y, por lo tanto, susceptible de ser translocado al núcleo para bloquear la activación de NF- κ B.

Estos resultados demuestran que en linfocitos T no activados no sólo existe un tráfico continuo de NF- κ B e I κ B α entre el núcleo y el citoplasma, sino también que este tráfico es un proceso extremadamente rápido que sólo puede detectarse cuando la exportación nuclear de proteínas es inhibida.

1.2.- Importancia funcional de la actividad basal de NF- κ B en linfocitos T CD $_4^+$

Se ha propuesto que los bajos niveles de replicación del VIH-1 existentes en las células T no activadas podrían deberse a la translocación nuclear basal de NF- κ B, necesaria para la activación de los genes implicados en la supervivencia celular. Conforme a esta hipótesis, en las células T CD $_4^+$ transfectadas con un vector de expresión del gen de la luciferasa bajo el control del LTR del VIH-1, se detectó una baja actividad transcripcional en ausencia de activación celular (Fig. 19). Esta actividad

transcripcional aumentó cuando se expresó la proteína viral Tat, también en condiciones de ausencia de activación. Para confirmar que la baja actividad del LTR observada en células T CD₄⁺ no activadas estaba causada por la existencia de bajos niveles de NF-κB activo, se incrementaron los niveles de IκBα de origen exógeno, mediante la transfección de un vector de expresión de IκBα (Fig. 19B), o de origen endógeno, mediante el tratamiento de las células con LMB (Fig. 19A). En ambos casos, la activación transcripcional del LTR del VIH-1 disminuyó notablemente, incluso cuando la proteína viral Tat era también sobreexpresada. Por otra parte, a pesar que en las células T activadas con PMA NF-κB no estaba unido a IκBα en el núcleo (Fig 18A), la sobreexpresión de IκBα también produjo una fuerte inhibición de la transactivación del LTR. Puesto que IκBα puede unirse a p65/RelA en el núcleo y transportarlo al citoplasma, nuestra hipótesis era que la actividad de NF-κB podía ser inhibida si aumentaba la concentración de IκBα (Fig. 19). Estos datos apoyan que los mecanismos implicados en las modificaciones postraduccionales de IκBα inducidas por PMA, que bloquean la formación de complejos NF-κB/IκBα (Ghosh et al., 1998; Holden et al., 2008; Steffan et al., 1995), pueden ser superadas por la sobreexpresión de IκBα.

Para confirmar el papel inhibitor de IκBα en un modelo de infección viral, un plásmido que contiene el clon viral NL4.3 fue transfectado en las células T CD₄⁺ no activadas junto con un vector de expresión de IκBα o junto con el vector pcDNA3.1 usado como control negativo (Fig. 20). La transfección se utilizó como método de infección porque el objetivo era analizar la influencia de la sobreexpresión de IκBα en la replicación viral en linfocitos activados y no activados, y en los modelos clásicos de infección se requiere la activación previa de las células T. Las tasas de transfección de linfocitos T son generalmente bajas, pero suficientes como para inducir la replicación completa del VIH-1 tras la estimulación con anti-CD₃ o PHA. En este sistema se planteaba la duda de si la proteína p24 detectada procedía de la producción viral transitoria derivada del plásmido en localización episomal o de la replicación viral completa a partir de un ADN proviral integrado. Sin embargo, la activación de las células T induce tanto la integración del VIH-1 como la transcripción viral. Por lo tanto, en las células T CD₄⁺ transfectadas con el pNL4.3 y posteriormente activadas con anti-CD₃ o PHA, al menos una proporción de p24 debe ser producida por la replicación completa del virus. Además, las concentraciones de p24 aumentaron a lo largo del tiempo de cultivo, indicando la existencia de varios ciclos de infección (Fig 20). En este

sistema experimental, la inhibición de la replicación del VIH-1 por la sobreexpresión de IκBα se produce preferentemente durante el primer ciclo, ya que en los siguientes ciclos se producirá la infección de células no transfectadas con IκBα. La concentración del plásmido IκBα transfectado se irá asimismo diluyendo por la degradación del ADN episomal y durante la división celular inducida por anti-CD₃ y PHA. De hecho, se detectó un retraso en la propagación del virus en el cultivo debida probablemente a una inhibición parcial del primer ciclo de replicación en las células transfectadas con el plásmido pCMV-IκBα (Fig. 20). El descenso en la producción de p24 en las células transfectadas con el vector de expresión de IκBα fue estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en las células activadas con anti-CD₃. En las células T CD₄⁺ activadas con PHA durante 7 días se encontró una reducción en cinco veces de la producción de p24. Aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, se observó una tendencia a la significación ($p = 0.081$) (Fig. 20A). Si bien es difícil precisar hasta que punto la producción de p24 en las células T no activadas estuvo mediada por la expresión transitoria del plásmido viral o por la replicación viral propiamente dicha, la sobreexpresión de IκBα disminuyó la transactivación del LTR y la producción de p24 en las células T CD₄⁺ no activadas. Estos datos indican que en los linfocitos T CD₄⁺ infectados el aumento de los niveles de IκBα contribuye a la inhibición de NF-κB, y a un control de la replicación viral.

En base a estos datos, proponemos un modelo para linfocitos T no activados en el que NFκB e IκBα están continuamente circulando entre el núcleo y el citosol y asociándose y disociándose en ambos compartimentos celulares, para permitir la activación de genes implicados en la supervivencia celular. Por tanto, en los linfocitos T CD₄⁺ infectados, el balance entre NFκB libre y los complejos NFκB/IκBα presentes en el núcleo participaría directamente en el mantenimiento de la latencia del VIH-1 cuando IκBα es predominante, o en la replicación viral basal si NFκB escapa del control de su inhibidor IκBα. Esta hipótesis es sostenida, por un lado por la existencia de mutantes de IκBα que inhiben la activación de NF-κB y la transactivación del VIH-1 (Kwon et al., 1998; Quinto et al., 1999), y por otro por la existencia de la replicación viral a bajo nivel descrita en linfocitos T no activados o en pacientes con TARGA (Eckstein et al., 2001; Lassen et al., 2004; Pomerantz et al., 1999; Zhang et al., 2004).

2.- ESTUDIO DE LA REPLICACIÓN DEL VIH-1 A TRAVÉS DE LA ESTIMULACIÓN DEL RECEPTOR TLR2 EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA

Mediante el reconocimiento de patrones moleculares expresados en virus, bacterias, hongos y parásitos, los receptores TLR forman la primera línea de defensa del organismo, alertándolo de la presencia de estos patógenos. Su estimulación, además de provocar la respuesta inmune innata, también participa en la generación de la respuesta inmune adaptativa inducida por las DC (Xu et al., 2004). Estudios recientes demuestran que los TLR no sólo se expresan en células del sistema inmune innato y en tejidos no inmunes que forman la barrera de protección frente a patógenos, sino también en las células T, principal tipo celular infectado por el VIH-1 (Gelman et al., 2004; Imanishi, et al., 2007; Kabelitz et al., 2007; Komai-Koma et al., 2004; Gelman et al., 2004; LaRosa et al., 2007). En concreto el receptor TLR2, esencial en la defensa frente a las infecciones causadas por bacterias Gram-positivas (Takeuchi et al., 2000), es funcional en la superficie de células T murinas (Cottalorda, et al., 2006) y humanas (Komai-Koma et al., 2004). Por último, componentes de la pared bacteriana, como por ejemplo PGN o LPS, liberados tras la lisis bacteriana, pueden alcanzar la circulación sistémica (Brenchley et al., 2006; Kobayashi et al., 2000) y estimular los receptores TLR expresados en las células T de sangre periférica.

La vía de señalización intracelular de todos los receptores TLR culmina en la activación de NF- κ B, principal factor de transcripción implicado en la activación de la replicación del VIH-1. Así, la estimulación específica de distintos TLR potencia la replicación del VIH-1 por ejemplo en células de bazo o del endotelio vascular (Equils et al., 2001 y 2003; Sundstrom et al., 2004). Sin embargo, pocos estudios han descrito la replicación del VIH-1 en células T directamente estimuladas con ligandos de TLR (Scheller et al., 2004; Thibault et al., 2007).

2.1.- Expresión de receptores TLR2 funcionales en células T

Las células T CD₃⁺, expandidas con PHA e IL-2, expresan ARNm (Fig. 21) y proteína TLR2, tanto a nivel intracelular como en la superficie (Fig. 22). De hecho, la mayoría de las células T que expresan TLR2 en su superficie, son células T CD₄⁺ (Fig. 23), principal diana de la infección por VIH-1. En relación a la expresión del ARNm de

TLR2 en células T, se han publicado resultados contradictorios (Komai-Koma et al., 2004; Gelman et al., 2004), debido probablemente al uso de sistemas celulares diferentes. En el estudio de Komai-Koma et al. (2004) se detectó la expresión de ARNm de TLR2 y TLR4 en células T humanas, mientras que Gelman et al. (2004) no pudieron detectar su expresión en células T de origen murino. Estos datos indican que los patrones de expresión de TLR en humanos y en ratones no son similares y por lo tanto, los datos de modelos murinos no pueden extrapolarse a células humanas. Sin embargo, estos dos estudios coinciden en que la activación del TCR induce la expresión de las proteínas TLR2, TLR4, TLR3 y TLR9, y que en las células T no activadas los niveles de expresión de estas proteínas son indetectables. En nuestro sistema, las células T expresaban los marcadores típicos de activación celular (Fig. 13). De acuerdo con estos datos, aproximadamente un 3% de las células T CD_3^+ expresaron la proteína TLR2 en su superficie. La activación del TCR con un anti- CD_3 aumentó la expresión de TLR2 en superficie (9%), aunque no se alcanzaron los mismos niveles que tras el tratamiento con PGN (18.2%).

La expresión tanto del ARNm como de la proteína TLR2 en la superficie de las células T aumentaron tras el tratamiento con PGN, principal componente de la pared de bacterias Gram-positivas y ligando específico del receptor TLR2 (Fig 21, 22B y 23). Estos resultados demuestran que en las células T, como ocurre en macrófagos, la estimulación del receptor TLR2 induce su propia expresión en la superficie celular (Hadley et al., 2005; Liu et al., 2001). Un dato interesante es que la proteína TLR2 se encontró acumulada en el citoplasma antes de la estimulación con PGN (Fig. 22A) y, por lo tanto, disponible para ser transportada rápidamente a la superficie celular en respuesta a estímulos. La expresión de TLR2 en la superficie de las células disminuyó tras 24 horas de tratamiento continuado con PGN, si bien los niveles citoplasmáticos se mantuvieron constantes y la expresión de ARNm continuó aumentando. En la señalización celular vía TLR, los mecanismos de retroalimentación negativa son imprescindibles para limitar la intensidad y la duración de las respuestas y, así evitar daños inmunológicos derivados de su activación prolongada, como enfermedades autoinmunes o inflamatorias (Lang & Mansell, et al., 2007). La disminución de la expresión de receptores TLR en la superficie celular mediada por la presencia de sus propios ligandos también ha sido descrita en células epiteliales de intestino (Otte et al., 2004). Además, las diferencias entre los niveles de expresión del ARNm y la proteína están controladas por la regulación de la transcripción y/o por las diferentes vidas

medias de las moléculas (Dodson, & Shapiro, 2002). De hecho, en células T humanas la cantidad de ARNm de TLR y la expresión de estas proteínas en la superficie no siempre correlacionan (Mansson et al., 2006). Puesto que las proteínas TLR2 expresadas en superficie deben degradarse tras su internalización, proponemos que el incremento en la expresión del ARNm es necesario para la reposición y el mantenimiento de los niveles citoplasmáticos de proteína TLR2.

Una vez confirmado que las células T CD_3^+ expresaban TLR2 en la superficie, comprobamos si estos receptores eran o no funcionales. Con este objetivo, se estudió la activación de NF- κ B en células T tratadas con PGN. La translocación nuclear de la proteína EYFP-p65 aumentó progresivamente a medida que el tiempo de tratamiento fue mayor (Fig. 24). La proteína I κ B α se degradó rápidamente tanto en el citoplasma como en el núcleo de los linfocitos T tratados con PGN y se indujo simultáneamente la fosforilación de p65/RelA en la Ser⁵³⁶ (Fig. 25A y B). Los heterodímeros NF- κ B inducidos en el núcleo de las células T tratadas con PGN no sólo tuvieron capacidad de unión al ADN sino que además eran transcripcionalmente activos, triplicando la transactivación dependiente de secuencias consenso - κ B (Fig. 25C y D). Aunque ha sido publicado que la estimulación de células T con ligandos de TLR2 induce la unión de NF- κ B al ADN (Bernier et al, 1998; Thibault et al., 2007), el mecanismo molecular subyacente a la activación de NF- κ B no fue descrito. En este trabajo demostramos que la actividad transcripcional de NF- κ B inducida en las células T CD_3^+ tratadas con PGN está mediada tanto por la degradación de I κ B α y la consiguiente translocación nuclear de p65/RelA como por la fosforilación de p65/RelA.

2.2.- El tratamiento con PGN aumenta la replicación del VIH-1 en células T

A pesar de que las células T CD_4^+ son el principal reservorio del VIH-1, hay pocos datos publicados sobre la replicación del virus inducida por la estimulación directa a través de los receptores TLR en general, y del TLR2 en particular. Se ha descrito que el tratamiento con oligodeoxinucleótidos ricos en motivos CpG, ligandos específicos del TLR9, incrementa la activación de NF- κ B y la reactivación del VIH-1 en células T latentemente infectadas (Scheller et al., 2004). Recientemente, se ha demostrado que la estimulación con ligandos sintéticos del receptor TLR2 aumenta la susceptibilidad de las células T a la infección por VIH-1 (Thibault et al., 2007).

En este trabajo, hemos estudiado si en las células T infectadas la actividad transcripcional de NF- κ B inducida tras la estimulación de los receptores TLR2 con PGN tiene algún efecto en la replicación del VIH-1. En primer lugar, observamos que en las células T la estimulación del TLR2 incrementó más de dos veces la transactivación del LTR del VIH-1 (Fig. 26A). Con respecto a estos datos, Bernier et al. (1998) describieron que la transactivación del LTR dependiente de secuencias - κ B aumentaba tras el tratamiento con el lipoarabinomano de *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, estos resultados tienen una menor relevancia clínica porque, en primer lugar se obtuvieron a partir de una línea celular linfoide y no a partir de células T de sangre humana, y en segundo lugar sólo se estudió la transactivación del LTR y no la replicación del VIH-1. En nuestro modelo analizamos la replicación del VIH-1 en células T CD₄⁺ expandidas a partir de PBMC de origen humano, infectadas con el virus NL-4.3-Renilla y tratadas con PGN durante 48 y 72 horas. La replicación del VIH-1, evaluada según la actividad de la luciferasa Renilla en los lisados celulares y la producción de p24 en los sobrenadantes del cultivo, aumentó significativamente tras el tratamiento con PGN (Fig. 26B y C). Resultados similares se describieron en células T CD₄⁺ estimuladas con Pam3CSK4, lipoproteína bacteriana sintética ligando de TLR2, durante las 24 y 72 horas previas a la infección por VIH-1 (Thibault et al., 2007).

En conclusión, estos datos demuestran que los linfocitos T CD₄⁺ humanos expresan en su superficie receptores TLR2 funcionales cuya expresión es modulada por PGN, su propio ligando. En linfocitos T humanos la estimulación con PGN induce la activación persistente de NF- κ B y potencia la replicación del VIH-1. Así, la activación de NF- κ B inducida por la estimulación del receptor TLR2 podría causar la reactivación del VIH-1 a partir de linfocitos T CD₄⁺ latentemente infectados. El hecho de que las células T CD₄⁺ expresen receptores TLR2 en su superficie pone de manifiesto que los productos microbianos pueden inducir directamente la activación policlonal de las células T. Es más, estos datos podrían explicar el incremento en la carga viral observado en los enfermos de VIH-1 co-infectados con patógenos oportunistas o tras la vacunación con microorganismos vivos o atenuados (Jones & Perelson, 2007, Pancharoen, et al., 2004; Sax & Singer, 1996). La activación crónica del sistema inmune causada por las infecciones recurrentes y persistentes, característica de la infección del VIH-1 (Brenchley et al., 2006), estaría parcialmente causada por la activación directa de los receptores TLR expresados en los linfocitos T CD₄⁺ de sangre periférica.

3.- ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES FUNCIONALES INDUCIDAS POR LA EXPRESIÓN CONSTITUTIVA DE LA PROTEÍNA Tat DEL VIH-1 EN CÉLULAS JURKAT

La replicación del VIH-1 está regulada tanto por factores celulares como virales. Entre estos últimos se encuentra la proteína reguladora Tat, imprescindible para la replicación viral (Karn, 1999). Tat permite la elongación eficiente de los transcritos virales mediante su interacción con el elemento TAR, ARN altamente estructurado localizado en el extremo 5' del ARNm naciente (Bannwarth & Gatignol, 2005; Calnan et al., 1991). Sin embargo, Tat también puede mediar la transactivación del LTR del VIH-1 de manera independiente de TAR, potenciando la retrotranscripción o interaccionando con factores de transcripción implicados en la replicación del VIH-1 como SP1, NF-AT y NF- κ B (Dandekar et al., 2004; Jeang et al., 1993 b; Kinoshita et al., 1999).

Entre las múltiples funciones de Tat destaca la modificación del ambiente celular gracias a su capacidad de modular la expresión de genes celulares, principalmente citoquinas, quimiocinas y sus receptores tales como TNF- α , CXCR4 o IL-8 (Bennasser et al., 2002; Gibellini et al., 2003; Ott et al., 1998). Además Tat activa factores de transcripción relacionados con el LTR como por ejemplo NF- κ B y SP1 (Chun et al., 1998; Liu et al., 1991). Mediante estos mecanismos Tat incrementa la replicación viral en la célula infectada (Brigati et al., 2003).

Otra propiedad interesante de Tat es su capacidad de solubilizarse al medio extracelular, donde tras la internalización por células próximas o lejanas, induce los mismos efectos que en las células activamente infectadas por el VIH-1 (Mann & Frankel, 1991). En estas condiciones, la proteína Tat es extremadamente tóxica y aunque su capacidad de inducir apoptosis está bien definida en distintos tipos celulares como neuronas (Haughey & Mattson, 2002), células endoteliales (Kim et al., 2003) y linfocitos (Li et al., 1995; Westendorp et al., 1995 a), el papel de Tat en la apoptosis todavía es controvertido. En concreto, las células infectadas por el VIH-1 que expresan Tat intracelularmente muestran resistencia a la apoptosis, mientras que las células no infectadas que han internalizado Tat extracelular son muy susceptibles a la apoptosis (McCloskey et al. 1997; Yang et al., 2003; Finkel et al., 1995). Sin embargo aún se

desconoce si las concentraciones de Tat *in vivo* son suficientes para mediar este efecto proapoptótico.

Dada la toxicidad de la proteína Tat extracelular y los efectos descritos en la modificación de múltiples funciones celulares, sería de gran utilidad obtener una línea celular linfoide establemente transfectada con Tat para poder analizar los cambios inducidos en la expresión de distintos genes celulares. De hecho, la propia toxicidad de Tat es la principal barrera para conseguir modelos celulares que expresen Tat constitutivamente. Utilizando el sistema de expresión Tet-Off, se obtuvieron células Jurkat establemente transfectadas con la proteína Tat del VIH-1. Aunque la expresión constitutiva de Tat en células Jurkat ha sido previamente descrita, ninguno de estos estudios ha profundizado en los cambios inducidos en la expresión de las proteínas celulares (Gibellini et al., 2002; Purvis et al., 1995; Zauli & Gibellini, 1996). El análisis de la expresión de Tat en las células Jurkat-Tat mostró una distribución principalmente nuclear (Fig. 27B y C), como ha sido previamente descrito (Efthymiadis et al. 1998; Hauber et al., 1989). Los experimentos de funcionalidad demostraron que un porcentaje elevado (aproximadamente 36%) de la población de células Jurkat-Tat expresaba la proteína Tat y que ésta era capaz de inducir la transactivación del LTR del VIH-1 (Fig. 29 y 30). Tras el tratamiento con doxiciclina, que suprimió la expresión de Tat en estas células, la transactivación del LTR disminuyó hasta alcanzar niveles similares a los de las células Jurkat Tet-Off, utilizadas como control. Estos resultados demuestran que la proteína Tat expresada constitutivamente en las células Jurkat-Tat es funcional en nuestro modelo celular. Los niveles de Tat producidos fueron similares a los fisiológicos en tanto que la expresión de ARNm fue similar en los transfectantes estables que en células infectadas con VIH-1 (Fig. 27A). Aunque los datos obtenidos a partir de líneas celulares establemente transfectadas con proteínas virales podrían no ser representativos de lo que ocurre durante la infección natural del VIH-1, al menos informan sobre las alteraciones funcionales que pueden ocurrir tras la expresión de la proteína viral durante la infección.

3.1.- La expresión constitutiva de Tat induce la activación de NF-κB

La máxima activación del LTR del VIH-1 requiere la acción sinérgica de Tat y NF-κB (Alcamí et al., 1995; Biswas et al., 1992; Liu et al., 1992). En las células Jurkat-Tat la transactivación del LTR disminuyó 120 veces cuando el elemento TAR fue

eliminado y esta disminución fue menor (25 veces) cuando se eliminaron las secuencias κ B del LTR (Fig. 30). Estos datos confirman que en las células Jurkat-Tat, la activación máxima del LTR del VIH-1 se consigue gracias a la acción sinérgica de NF- κ B y Tat. Por otra parte y de acuerdo con datos previamente publicados (Dandekar et al., 2008; Demarchi et al., 1996 y 1999) se observó un aumento de la actividad NF- κ B en las células Jurkat-Tat ya que la expresión del vector 3- κ B-LUC que contiene varias secuencias κ B fue 108 veces superior en las células Jurkat-Tat que en las Tet-Off utilizadas como controles (Fig. 31).

La mayor actividad de NF- κ B fue debida a que la translocación nuclear de p65/RelA, la cantidad de p65/RelA total y fosforilado en la Ser⁵³⁶, así como la capacidad de unión al ADN de los heterodímeros p65/p50 aumentaron en el núcleo de las células Jurkat-Tat en comparación con los controles (Fig. 32A; Fig. 33A y B). Entre los mecanismos de regulación de NF- κ B se encuentra la expresión de su inhibidor I κ B α . En concordancia con este mecanismo I κ B α fue sobreexpresado en el citoplasma de las células Jurkat-Tat (Fig. 33C y D). Sin embargo, dado que los niveles de I κ B α fosforilado también están aumentados en el citoplasma de las células Jurkat-Tat, este I κ B α probablemente sea degradado. De hecho, la expresión transitoria de Tat potencia la activación de NF- κ B mediante la degradación de I κ B α en células estimuladas con TNF α (Beauparlant et al., 1996; Demarchi et al., 1996).

Por lo tanto el control de la transactivación del LTR del VIH-1 mediado por Tat requiere la presencia del elemento TAR funcional y la activación de NF- κ B. Los datos aquí mostrados demuestran que la expresión de Tat aumenta la presencia en el núcleo de la proteína p65/RelA fosforilada, con menor avidez por I κ B α que p65/RelA (Bohuslav et al., 2004) y que por tanto sería capaz de unirse más fácilmente al ADN. La activación de NF- κ B induce a su vez una mayor expresión de I κ B α , que es fosforilado y degradado en las células Jurkat-Tat para poder mantener la activación de NF- κ B.

3.2.- La expresión constitutiva de Tat induce alteraciones funcionales del citoesqueleto

La proteína Tat del VIH-1 es un factor implicado en la patogénesis de la infección de VIH-1 a través de múltiples mecanismos entre los que se encuentran la modulación de la expresión de genes celulares y la alteración de procesos fisiológicos,

tanto en las células infectadas como en las no infectadas que han internalizado la proteína Tat extracelular. Utilizando técnicas de proteómica se observó en las células Jurkat-Tat la menor expresión de proteínas relacionadas con el citoesqueleto, concretamente con la red de filamentos de actina (Fig. 34 y tabla 8).

Las funciones específicas de algunas de las proteínas del citoesqueleto infraexpresadas en las células Jurkat-Tat explican porque estas células presentaron una disminución en la quimiotaxis inducida por SDF-1 α así como mayores porcentajes de polimerización de actina y polarización celular. Además, el tamaño y la complejidad celular, propiedades controladas por el citoesqueleto de actina (Fenteany & Glogauer, 2004), aumentaron tras la expresión constitutiva de Tat en células Jurkat-Tat (Fig. 35).

Las rápidas reorganizaciones del citoesqueleto de actina son necesarias en procesos celulares dinámicos como la migración celular o el transporte intracelular. En condiciones fisiológicas los monómeros de actina polimerizan en filamentos. Sin embargo, la despolimerización espontánea es demasiado lenta para poder mantener reorganizaciones tan dinámicas como las observadas *in vivo* (Ono, 2007). Por tanto, la reorganización de los filamentos de actina requiere la acción de proteínas asociadas encargadas de romper y polimerizar los filamentos, como son la gelsolina y la cofilina (Dos Remedios et al., 2003). La capacidad de quimiotaxis es una propiedad inherente de los linfocitos (Howard & Watts, 1994). Durante la quimiotaxis se inducen, de manera rápida y coordinada, modificaciones en la polimerización de actina necesarias para la formación eficiente de las profusiones y la determinación de la dirección del movimiento (DesMarais et al., 2005; Ono, 2007; Samstag et al., 2003). Para ello, las células no estimuladas tienen que mantener niveles elevados de actina monomérica (DiNubile et al., 1995). A pesar de que en las células Jurkat-Tat los niveles totales de β -actina y actina citoplasmáticas están reducidos (Fig. 34C y tabla 8), estas células mostraron una mayor polimerización de actina en ausencia de SDF-1 α , lo que indicaría que son los niveles de actina monomérica, y no los de actina polimerizada, los que están reducidos (Fig. 38A). De acuerdo con esta hipótesis, se observó que los filamentos de actina no incrementaron su polimerización tras la quimioatracción con SDF-1 α (Fig. 38B). Esta descoordinación en la capacidad de polimerización y despolimerización podría deberse a que no existe suficiente actina monomérica disponible para la polimerización, tanto por estar menos expresada como por el déficit de proteínas

encargadas de su recambio, como la cofilina (Carrier et al., 1999; McGough et al., 2001; Theriot, 1997).

Puesto que la extensión de las protusiones celulares en respuesta a estímulos migratorios está acoplada a la polimerización de actina, la polimerización aumentada de los filamentos de actina en las células Jurkat-Tat explicaría que un mayor número de células presentase una morfología polarizada en ausencia de SDF-1 α (Fig. 37). Dado que la adquisición de la morfología polarizada es un requisito imprescindible para la migración linfocitaria (Sánchez-Madrid & del Pozo, 1999) estos resultados a su vez explicarían por qué las células Jurkat-Tat migren más que los controles en ausencia de estímulo quimioatractivo (Fig. 36B). De acuerdo con la estabilidad de la polimerización de actina en las células Jurkat-Tat, no se modificó la polarización celular tras el tratamiento con SDF-1 α .

La cofilina no sólo participa en el recambio de los monómeros de actina sino también en su propia polimerización, ya que mediante la rotura de los filamentos crea otros más pequeños cuyos extremos se utilizan para la polimerización de nuevos filamentos de actina (Ichetovkin et al., 2002; Pollard et al., 2000). Así la cofilina interviene en la determinación de la dirección y la velocidad del movimiento en respuesta a estímulos quimiotácticos (DesMarais et al., 2005; Theriot, 2007). Se ha descrito que las células que no expresan cofilina (Chen et al., 2001 b) presentan defectos en la migración y su sobreexpresión induce una mayor movilidad (Aizawa et al., 1996). Estos datos coinciden con nuestros resultados, puesto que las células Jurkat-Tat, en las que la cofilina está infraexpresada, tienen menor capacidad de migración frente a SDF-1 α que las células Jurkat Tet-Off usadas como controles (Fig. 36A). Sin embargo, en ausencia de SDF-1 α las células Jurkat-Tat tienen mayor capacidad migratoria que los controles, reflejando el incremento de la polimerización de actina y, en general, la gran desregulación del citoesqueleto que induce la expresión de Tat.

La sobreexpresión de gelsolina incrementa las ondulaciones de la membrana y la quimiotaxis (Cunningham et al., 1991 y 1992; Sun et al., 1997). Por lo tanto, su infraexpresión en las células Jurkat-Tat podría contribuir parcialmente a la reducción de la respuesta quimiotáctica frente a SDF-1 α descrita en estas células (Fig. 36A). Otros grupos han descrito que Tat puede inducir la expresión de CXCR4, principal receptor de SDF-1 α (Gibellini et al., 2003). Dado que niveles similares de CXCR4 fueron detectados en la superficie celular de Jurkat-Tat y Jurkat Tet-Off (Fig. 36C), se descartó

que el defecto en la respuesta quimiotáctica fuese causado por la internalización del receptor inducida por Tat.

Por tanto la disminución en la capacidad de migración en respuesta a SDF-1 α de las células Jurkat-Tat se debe a defectos en la polimerización de los filamentos de actina relacionados con la infraexpresión de la actina, la cofilina y la gelsolina. Puesto que los linfocitos se reclutan a los sitios de infección, inflamación o daño tisular mediante procesos de quimiotaxis (Sánchez-Madrid & del Pozo, 1999), la expresión intracelular de Tat participaría directamente en la inmunodepresión causada por el VIH-1.

Sin embargo, el citoesqueleto interviene en otros procesos fisiológicos diferentes de la migración, que también están implicados en la patogénesis del VIH-1, como son la apoptosis o el tráfico intracelular de vesículas. La Anexina II media las interacciones entre los dominios de la membrana celular ricos en colesterol y el citoesqueleto de actina y participa en procesos de tráfico de vesículas (Rescher & Gerke, 2004; Waisman, 1995). En relación con el VIH-1, la Anexina II es un cofactor celular que facilita el proceso infectivo al intervenir tanto en la internalización como en la circulación del virus dentro de la célula (Chan & Kim, 1998; Ma et al., 2004). En general la inhibición de proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina bloquea la infección por VIH-1 y la transmisión célula-célula del virus (Freed & Mouland, 2006; Komano et al., 2004). Por lo tanto en las células Jurkat-Tat la infraexpresión de Anexina II y las alteraciones en el citoesqueleto de actina actuarían como una barrera protectora de la célula infectada al evitar las reinfecciones, que supondrían su muerte prematura.

Finalmente, proponemos que esta desorganización del citoesqueleto inducida por la expresión intracelular de Tat provocaría la disrupción del tráfico intracelular de vesículas responsable de la infraexpresión de marcadores celulares como CD4 o MHC-I (Collins et al., 1998; Lindwasser et al., 2007), situación que dificultaría el reconocimiento inmunológico de la célula infecta por el VIH-1. Asimismo la alteración de los procesos de fusión de membranas evitaría la formación de sincitios citopáticos, preservando así la integridad de las células infectadas.

3.3.- La expresión constitutiva de Tat protege frente a la apoptosis

Se ha comentado anteriormente que Tat tiene propiedades tanto pro- como anti-apoptóticas. En nuestro sistema celular, la expresión intracelular de Tat no resultó tóxica

en las células Jurkat-Tat en comparación con los controles (Fig. 39). De hecho la expresión de Tat protegió frente a la apoptosis inducida por distintos estímulos, como tunicamicina y ligando de Fas. Estos datos coinciden con publicaciones previas que apoyan la teoría de que la expresión intracelular de Tat protege a las células infectadas de la apoptosis (Gibellini et al., 2001; McCloskey et al., 1997; Pocernich et al., 2005; Zauli & Gibellini, 1996).

La infraexpresión de gelsolina y de α -tubulina explica como podría estar mediada la protección frente a estímulos apoptóticos observada en las células Jurkat-Tat. La gelsolina es un sustrato de la caspasa 3, caspasa efectora tanto en la vía de apoptosis exógena como en la vía mitocondrial (Kamada et al., 1998; Kothakota et al., 1997). Tras la ruptura mediada por la caspasa 3 de la gelsolina, ésta ya no requiere Ca^{2+} para cortar los filamentos de actina y, por tanto los corta independientemente de la concentración de Ca^{2+} . Así se desmantela la estructura del citoesqueleto en la zona de la membrana y se empiezan a formar las burbujas características de la primera fase de la apoptosis (Laster & Mackenzie, 1996). Se ha descrito que en neutrófilos que no expresan gelsolina el comienzo de la apoptosis se ve retrasado (Kothakota et al., 1997). Otros datos apoyan el papel pro-apoptótico de la gelsolina, como por ejemplo que la mayoría de las células cancerígenas muestren una reducción significativa de su expresión (Dong et al., 1999). Por lo tanto, en las células Jurkat-Tat la disminución de la rotura de filamentos de actina mediada por la gelsolina preservaría la integridad celular evitando la apoptosis. Además, la infraexpresión de α -tubulina debe afectar a la formación de los dímeros α/β -tubulina y a la polimerización de los microtúbulos. Se ha descrito que la interacción de Tat con los microtúbulos y/o la tubulina induce apoptosis mediante la liberación de la proteína pro-apoptótica Bim y del citocromo c (Chen et al., 2002; de Mareuil et al. 2005). Por tanto, la infraexpresión de la α -tubulina observada en las células Jurkat-Tat reduciría la inducción de apoptosis mediada por la interacción Tat con los microtúbulos.

Por otro lado, se ha discutido anteriormente que en las células Jurkat-Tat la activación de NF- κ B está altamente potenciada. La activación de NF- κ B es un elemento clave en la regulación de la apoptosis celular. En la mayoría de las circunstancias se ha demostrado que NF- κ B es un factor de supervivencia celular, capaz de proteger frente a estímulos pro-apoptóticos como TNF- α , fármacos quimioterapéuticos o radiaciones ionizantes, aunque también puede ser un inductor de apoptosis (Barkett & Gilmore,

1999; Doi et al. 1999; Foo & Nolan, 1999). Así la mayor actividad transcripcional de NF- κ B en las células Jurkat-Tat pondría en marcha mecanismos implicados en la protección frente a la apoptosis tales como la expresión de proteínas anti-apoptóticas que inhiben la activación de caspasas efectoras como las proteínas de la familia IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis) o la proteína FLIP (proteína inhibitoria de FLICE) y miembros de la familia de Bcl2 (Gil et al., 2004). Sin embargo, estos mecanismos aún no han sido estudiados en nuestro sistema celular.

En resumen, en relación con la apoptosis, la expresión constitutiva de Tat promueve una menor expresión de algunas proteínas del citoesqueleto, y así retrasaría los procesos de reorganización del citoesqueleto implicados en la apoptosis, y mantendría por más tiempo la integridad celular. La activación de NF- κ B inducida por la expresión de Tat incrementaría la expresión de genes implicados en la supervivencia celular y de otros genes que participan directamente en el bloqueo de la apoptosis.

En su conjunto los datos descritos en este trabajo explican como la proteína Tat del VIH-1 participa en la patogénesis viral, disminuyendo la capacidad de quimiotaxis y permitiendo que el virus infecte a los linfocitos T sin destruirlos, lo que a su vez facilita que las células infectadas actúen como reservorios virales que producen virus de forma continua.

- 1.- En linfocitos T humanos no activados existe un tráfico núcleo-citoplásmico continuo y dinámico de NF- κ B e I κ B α que sólo puede detectarse cuando se bloquea la exportación nuclear de proteínas.
- 2.- La continua resíntesis de I κ B α es un requisito necesario para hacer posible su translocación nuclear en los linfocitos T en reposo.
- 3.- En linfocitos T CD $_4^+$ no activados existe una actividad basal residual de NF- κ B, capaz de inducir la transactivación del LTR del VIH-1 y una replicación viral a bajo nivel, y que puede ser inhibida por la sobreexpresión de I κ B α .
- 4.- Las células T CD $_4^+$ expresan bajos niveles de receptores TLR2 en su superficie, cuya expresión es regulada por su propio ligando el peptidoglicano. La proteína TLR2 se acumula en el citoplasma de las células T y está disponible para translocarse a la superficie celular tras la estimulación con peptidoglicano.
- 5.- La activación de los receptores TLR2 por el tratamiento con peptidoglicano induce la activación de NF- κ B, mediante la degradación de I κ B α y la fosforilación de p65/RelA, e incrementa la transactivación del LTR del VIH-1 y la replicación viral de manera significativa.
- 6.- Existe una fuerte sinergia entre NF- κ B y Tat en la transactivación del LTR del VIH-1 en las células Jurkat que expresan constitutivamente la proteína Tat del VIH-1.
- 7.- En las células Jurkat-Tat la actividad del factor NF- κ B está potenciada. Tat induce la actividad transcripcional de NF- κ B mediante su acumulación nuclear y la fosforilación en la Ser⁵³⁶ de p65/RelA.
- 8.- La expresión constitutiva de Tat en células Jurkat reduce la expresión de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto β -actina, actina citosólica, β -tubulina, anexina II, gelsolina β , cofilina I y proteínas del complejo Rac/Rho-GDI.

9.- La expresión constitutiva de Tat produce alteraciones funcionales del citoesqueleto celular, tales como una mayor polimerización basal de actina y una menor capacidad de polarización celular y de migración en respuesta a SDF-1 α .

10.- La expresión intracelular de Tat en células Jurkat protege frente a la apoptosis inducida por diferentes estímulos como la tunicamicina y el ligando de Fas/CD95.

- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol.* 174(8):4453-60.
- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA. 1986. Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59: 284-291.
- Aizawa H, Sutoh K, Yahara I. 1996. Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling and cell movement in *Dictyostelium*. *J Cell Biol* 132:335–344.
- Albini A, Benelli R, Giunciuglio D, Cai T, Mariani G, Ferrini S, Noonan DM. 1998 (a). Identification of a novel domain of HIV tat involved in monocyte chemotaxis. *J Biol Chem.* 273(26):15895-900.
- Albini A, Ferrini S, Benelli R, Sforzini S, Giunciuglio D, Aluigi MG, Proudfoot AE, Alouani S, Wells TN, Mariani G, Rabin RL, Farber JM, Noonan DM. 1998 (b). HIV-1 Tat protein mimicry of chemokines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(22):13153-8.
- Albini A, Soldi R, Giunciuglio D, Giraudo E, Benelli R, Primo L, Noonan D, Salio M, Camussi G, Rockl W, Bussolino F. 1996. The angiogenesis induced by HIV-1 tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med.* 2(12):1371-5.
- Alcami J, Lain de Lera T, Folgueira L, Pedraza MA, Jacque JM, Bachelerie F, Noriega AR, Hay RT, Harrich D, Gaynor RB, et al. 1995. Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO J*, 14(7):1552-60.
- Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A y Ben-Neriah Y. 1995. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(23):10599-603.

- Amieva MR, Furthmayr H. 1995. Subcellular localization of moesin in dynamic filopodia, retraction fibers, and other structures involved in substrate exploration, attachment, and cell-cell contacts. *Exp Cell Res.* 219(1):180 -96.
- Appay V, Sauce D. 2008. Immune activation and inflammation in HIV-1 infection: causes and consequences. *J Pathol.* 214(2):231-41.
- Arenzana-Seisdedos F, Fernandez B, Dominguez I, Jacqu  JM, Thomas D, Diaz-Meco MT, Moscat J, Virelizier JL. 1993. Phosphatidylcholine hydrolysis activates NF-kappa B and increases human immunodeficiency virus replication in human monocytes and T lymphocytes. *J Virol.* 67(11):6596-604.
- Arenzana-Seisdedos F, Thompson J, Rodriguez MS, Bachelierie F, Thomas D y Hay RT. 1995. Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Cell Biol.*;15(5):2689-96.
- Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, Thomas D, Hay RT, Virelizier JL y Dargemont C. 1997. Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J. Cell. Sci.*, 110:369-378.
- Bachelierie F, Alami J, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL. 1991. HIV enhancer activity perpetuated by NF-kappa B induction on infection of monocytes. *Nature* 350:709-712.
- B fica A, Scanga CA, Schito M, Chaussabel D, Sher A. 2004. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J. Immunol.* 172:7229-7234.
- Bannwarth S, Gatignol A. 2005. HIV-1 TAR RNA: the target of molecular interactions between the virus and its host. *Curr HIV Res.* 3(1):61-71.
- Barillari G, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. 1993. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using

- integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(17):7941-5.
- Barillari G, Sgadari C, Fiorelli V, Samaniego F, Colombini S, Manzari V, Modesti A, Nair BC, Cafaro A, Stürzl M, Ensoli B. 1999. The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood* 94(2):663-72.
- Barkett M, Gilmore TD. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 1999 Nov 22;18(49):6910-24.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, xler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- Barreto-de-Souza V, Xavier Medeiros T, Machado Motta MC, Chequer Bou-Habib D, Saraiva EM. 2008. HIV-1 infection and HIV-1 Tat protein permit the survival and replication of a non-pathogenic trypanosomatid in macrophages through TGF-beta1 production. *Microbes Infect.* 10(6):642-9.
- Basmaciogullari S, Babcock GJ, Van Ryk D, Wojtowicz W, Sodroski J. 2002. Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for CXCR4 binding. *J Virol.* 2002 76(21):10791-800.
- Beauparlant P, Kwon H, Clarke M, Lin R, Sonenberg N, Wainberg M, Hiscott J. 1996. Transdominant mutants of I kappa B alpha block Tat-tumor necrosis factor synergistic activation of human immunodeficiency virus type 1 gene expression and virus multiplication. *J Virol.* 70(9):5777-85.
- Bednarik DP, Cook JA, Pitha PM. 1990. Inactivation of the HIV LTR by DNA CpG methylation: evidence for a role in latency. *EMBO J.* 9(4):1157-64.
- Beg AA, Ruben SM, Scheinman RI, Haskill S, Rosen CA, Baldwin AS Jr. 1995. I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-

- kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev.*, 1899-913. Errata en: *Genes Dev*, 6(12B):2664-5.
- Benkirane M, Chun RF, Xiao H, Ogryzko VV, Howard BH, Nakatani Y, Jeang KT. 1998. Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J Biol Chem.* 273(38):24898-905.
- Bennasser Y, Badou A, Tkaczuk J, Bahraoui E. 2002. Signaling pathways triggered by HIV-1 Tat in human monocytes to induce TNF-alpha. *Virology* 303(1):174-80.
- Bennasser Y, Bahraoui E. 2002. HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-betaII and -delta. *FASEB J.* 16(6):546-54.
- Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, Sattentau QJ, Schuitemaker H, Sodroski J, Weiss RA. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391: 240.
- Berkhout B, Gatignol A, Rabson AB, Jeang KT. 1990. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell.* 24;62(4):757-67.
- Berkhout B, Silverman RH, Jeang KT. 1989. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell.* 20;59(2):273-82.
- Bernier R, Barbeau B, Olivier M, Tremblay MJ. 1998. Mycobacterium tuberculosis mannose-capped lipoarabinomannan can induce NF-kappaB-dependent activation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat in T cells. *J Gen Virol.* 79 (Pt 6):1353-61.
- Betts MR, Ambrozak DR, Douek DC, Bonhoeffer S, Brenchley JM, Casazza JP, Koup RA, Picker LJ. 2001. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+)T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J Virol.* 75(24):11983-91.

- Beutler B, Poltorak A. 2001. The sole gateway to endotoxin response: how LPS was identified as Tlr4, and its role in innate immunity. *Drug Metab Dispos.* 29(4 Pt 2):474-8.
- Birbach A, Gold P, Binder BR, Hofer E, de Martin R & Schmid JA. 2002. Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.*, 277, 10842-10851.
- Biswas DK, Ahlers CM, Dezube BJ, Pardee AB. 1993. Cooperative inhibition of NF-kB and Tat-induced superactivation of human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11044–11048.
- Bohuslav J, Chen LF, Kwon H, Mu Y, Greene WC. 2004. p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *J Biol Chem* 279(25):26115-25.
- Bonizzi G, Karin M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25:280-288.
- Brady J, Kashanchi F. 2005. Tat gets the "green" light on transcription initiation. *Retrovirology.* 9;2:69.
- Brake DA, Debouck C, Biesecker G. 1990. Identification of an Arg-Gly-Asp (RGD) cell adhesion site in human immunodeficiency virus type 1 transactivation protein, tat. *J Cell Biol.* 111(3):1275-81.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, Kazzaz Z, Bornstein E, Lambotte O, Altmann D, Blazar BR, Rodriguez B, Teixeira-Johnson L, Landay A, Martin JN, Hecht FM, Picker LJ, Lederman MM, Deeks SG, Douek DC. 2006. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 12:1365-1371.
- Brès V, Tagami H, Péloponèse JM, Loret E, Jeang KT, Nakatani Y, Emiliani S, Benkirane M, Kiernan RE. 2002. Differential acetylation of Tat coordinates its interaction with the co-activators cyclin T1 and PCAF. *EMBO J.* 16;21(24):6811-9.

- Brigati C, Giacca M, Noonan DM, Albin A. 2003. HIV Tat, its TARgets and the control of viral gene expression. *FEMS Microbiol Lett.* 220(1):57-65.
- Calnan BJ, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD. 1991. Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes Dev.* 5:201–210.
- Campbell GR, Pasquier E, Watkins J, Bourgarel-Rey V, Peyrot V, Esquieu D, Barbier P, de Mareuil J, Braguer D, Kaleebu P, Yirrell DL, Loret EP. 2004. The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J Biol Chem.* 279(46):48197-204.
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia G-X, Hong Y, Chua N-H, Pantaloni D. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/Cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136:1307–1323.
- Carlier MF, Ressad F, Pantaloni D. 1999. Control of Actin Dynamics in Cell Motility. *ROLE OF ADF/COFILIN.* *J Biol Chem,* 274(48):33827-33830.
- Carlotti F, Dower SK, Qwarnstrom EE. 2000. Dynamic shuttling of nuclear factor kappa B between the nucleus and cytoplasm as a consequence of inhibitor dissociation. *J Biol Chem.* 275(52):41028-34.
- Caron G, Duluc D, Frémaux I, Jeannin P, David C, Gascan H, Delneste Y. 2005. Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells. *J Immunol.* 175(3):1551-7.
- Carroll R, Martarano L, Derse D. 1991. Identification of lentivirus tat functional domains through generation of equine infectious anemia virus/human immunodeficiency virus type 1 tat gene chimeras. *J Virol.* 65(7):3460-7.
- Chan DC, Kim PS. 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell.* 93(5):681-4.

- Chang YN, Jeang KT. 1992. The basic RNA-binding domain of HIV-2 Tat contributes to preferential trans-activation of a TAR2-containing LTR. *Nucleic Acids Res.* 20(20):5465-72.
- Chen D, Wang M, Zhou S, Zhou Q. 2002. HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim. *EMBO J.* 21(24):6801-10.
- Chen J, Godt D, Gunsalus K, Kiss I, Goldberg M, Laski FA. 2001 b. Cofilin/ADF is required for cell motility during *Drosophila* ovary development and oogenesis. *Nature Cell Biol.* 3:204–209.
- Chen Lf, Fischle W, Verdin E, Greene WC. 2001 a. Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science.* 293:1653-1657.
- Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 9(13):1586-97.
- Cheng JD, Ryseck RP, Attar RM, Dambach D, Bravo R. 1998. Functional redundancy of the nuclear factor-kB inhibitors Ikb α and Ikb β . *J. Exp. Med.*, 188, 1055–1062.
- Chun RF, Semmes OJ, Neuveut C, Jeang KT. 1998. Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol.* 72(4):2615-29.
- Chun T. W., L. Stuyver, S. B. Mizell, L. A. Ehler, J. A. Mican, M. Baseler, A. L. Lloyd, M. A. Nowak, and A. S. Fauci. 1997. Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:13193-13197.
- Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, Klatzmann D, Champalimaud JL, Montagnier L. 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233: 343-346

- Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, Weiss R. 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* 321: 10.
- Collins KL, Chen BK, Kalams SA, Walker BD, Baltimore D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. 391(6665):397-401.
- Cota-Gomez A, Flores NC, Cruz C, Casullo A, Aw TY, Ichikawa H, Schaack J, Scheinman R, Flores SC. 2002. The human immunodeficiency virus-1 Tat protein activates human umbilical vein endothelial cell E-selectin expression via an NF-kappa B-dependent mechanism. *J Biol Chem*. 277(17):14390-9.
- Cottalorda A, Vershelde C, Marçais A, Tomkowiak M, Musette P, Uematsu S, Akira S, Marvel J, Bonnefoy-Berard N. 2006. TLR2 engagement on CD8 T cells lowers the threshold for optimal antigen-induced T cell activation. *Eur J Immunol*. 36(7):1684-93.
- Cunningham CC, Gorlin JB, Kwiatkowski DJ, Hartwig JH, Janmey PA, Byers HR, Stossel TP. 1992. Actin-binding protein requirement for cortical stability and efficient locomotion. *Science*. 255(5042):325-7.
- Cunningham CC, Stossel TP, Kwiatkowski DJ. 1991. Enhanced motility in NIH 3T3 fibroblasts that overexpress gelsolin. *Science*. 251(4998):1233-6.
- Dandekar DH, Ganesh KN, Mitra D. 2004. HIV-1 Tat directly binds to NFkappaB enhancer sequence: role in viral and cellular gene expression. *Nucleic Acids Res*. 32(4):1270-8.
- De Cock KM, Adjorlolo G, Ekpini E, Sibailly T, Kouadio J, Maran M, Brattegaard K, Vetter KM, Doorly R, Gayle HD. 1993. Epidemiology and transmission of HIV-2. Why there is no HIV-2 pandemic. *JAMA* 270: 2083-2086.
- de Mareuil J, Carre M, Barbier P, Campbell GR, Lancelot S, Opi S, Esquieu D, Watkins JD, Prevot C, Braguer D, Peyrot V, Loret EP. 2005. HIV-1 Tat protein enhances microtubule polymerization. *Retrovirology*. 2:5.

- Demarchi F, d'Adda di Fagagna F, Falaschi A, Giacca M. 1996. Activation of transcription factor NF-kappaB by the Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 70(7):4427-37.
- Demarchi F, Gutierrez MI, Giacca M. 1999. Human immunodeficiency virus type 1 tat protein activates transcription factor NF-kappaB through the cellular interferon-inducible, double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR. *J Virol.* 73(8):7080-6.
- Derse D, Carvalho M, Carroll R, Peterlin BM. 1991. A minimal lentivirus Tat. *J Virol.* 65(12):7012-5.
- DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J. 2005. Cofilin takes the lead. *Journal of Cell Science* 118, 19-26.
- DiNubile MJ, Cassimeris L, Joyce M, Zigmond SH. 1995. Actin filament barbed-end capping activity in neutrophil lysates: the role of capping protein-beta 2. *Mol Biol Cell.* 6(12):1659-71.
- Dodson RE, Shapiro DJ. 2002. Regulation of pathways of mRNA destabilization and stabilization. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 72:129-64.
- Doi TS, Marino MW, Takahashi T, Yoshida T, Sakakura T, Old LJ, Obata Y. Absence of tumor necrosis factor rescues RelA-deficient mice from embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 16;96(6):2994-9.
- Dong Y, Asch HL, Medina D, Ip C, Ip M, Guzman R, Asch BB. 1999. Concurrent deregulation of gelsolin and cyclin D1 in the majority of human and rodent breast cancers. *Int J Cancer.* 81(6):930-8.
- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 83(2):433-73.
- Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Okamoto Y, Casazza JP, Kuruppu J, Kunstman K, Wolinsky S, Grossman Z, Dybul M, Oxenius A, Price

- DA, Connors M, Koup RA. 2002. HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417:95-98.
- Doyle SL, O'Neill LA. 2006. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. *Biochem Pharmacol.* 72:1102-13.
- Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, Clark R, Dalhoff K, Zabel P, Vollmer E. 2003. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human lung. *Histochem Cell Biol.* 119(2): 108-113.
- Drubin DG, Nelson WJ. 1996. Origins of cell polarity. *Cell.* 84(3):335-44.
- Duh EJ, Maury WJ, Folks TM, Fauci AS, Rabson AB. 1989. Tumor necrosis factor alpha activates human immunodeficiency virus type 1 through induction of nuclear factor binding to the NF-kappa B sites in the long terminal repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5974-5978.
- Eberharter A, Becker,PB. 2002. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin: second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* 3, 224–229.
- Eckstein DA, Penn ML, Korin YD, Scripture-Adams DD, Zack JA, Kreisberg JF, Roederer M, Sherman MP, Chin PS, Goldsmith MA. 2001. HIV-1 actively replicates in naive CD4(+) T cells residing within human lymphoid tissues. *Immunity* 15(4):671-82.
- Efthymiadis A, Briggs LJ, Jans DA. 1998. The HIV-1 Tat nuclear localization sequence confers novel nuclear import properties. *J Biol Chem.* 1998 Jan 16;273(3):1623-8.
- Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, Gendelman R, Morgan RA, Wingfield P, Gallo RC. 1993. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J Virol.* 67(1):277-87.

- Equils O, Faure E, Thomas L, Bulut Y, Trushin S, Arditi M. 2001. Bacterial lipopolysaccharide activates HIV long terminal repeat through Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 166:2342-2347.
- Equils O, Schito ML, Karahashi H, Madak Z, Yarali A, Michelsen KS, Sher A, Arditi M. 2003. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR9 signaling results in HIV-long terminal repeat trans-activation and HIV replication in HIV-1 transgenic mouse spleen cells: implications of simultaneous activation of TLRs on HIV replication. *J. Immunol.* 170:5159-5164.
- Fauci AS. 1993. Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy. *Science.* 262(5136):1011-8.
- Faulstich H, Zobeley S, Rinnerthaler G, Small JV. 1988. Fluorescent phallotoxins as probes for filamentous actin. *J Muscle Res Cell Motil.* 9(5):370-83.
- Fazeli A, Bruce C, Anumba DO. 2005. Characterization of Toll-like receptors in the female reproductive tract in humans. *Hum Reprod.* 20(5):1372-8.
- Fenteany G, Glogauer M. 2004. Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol.* 11(1):15-24. Errata en: *Curr Opin Hematol.* 11(2):112.
- Festenstein R, Pagakis SN, Hiragami K, Lyon D, Verreault A, Sekkali B, Kioussis D. 2003. Modulation of heterochromatin protein 1 dynamics in primary Mammalian cells. *Science* 299(5607):719-21.
- Finco TS, Baldwin AS. 1995. Mechanistic aspects of NF-kappa B regulation: the emerging role of phosphorylation and proteolysis. *Immunity,* 3(3):263-72.
- Finzi D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano. 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* 5:512-517.
- Flores SC, Marecki JC, Harper KP, Bose SK, Nelson SK, McCord JM. 1993. Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 represses expression of

- manganese superoxide dismutase in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90(16):7632-6.
- Foo SY, Nolan GP. NF-kappaB to the rescue: RELs, apoptosis and cellular transformation. *Trends Genet*. 1999 Jun;15(6):229-35.
- Franza BR Jr, Rauscher FJ 3rd, Josephs SF, Curran T. 1988. The Fos complex and Fos-related antigens recognize sequence elements that contain AP-1 binding sites. *Science*. 239(4844):1150-3.
- Freed EO, Mouland AJ. 2006. The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 3:77.
- Frenkel LM, Wang Y, Learn GH, McKernan JL, Ellis GM, Mohan KM, Holte SE, De Vange SM, Pawluk DM, Melvin AJ, Lewis PF, Heath LM, Beck IA, Mahalanabis M, Naugler WE, Tobin NH, Mullins JI. 2003. Multiple viral genetic analyses detect low-level human immunodeficiency virus type 1 replication during effective highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 77(10):5721-30.
- Fujinaga K, Cujec TP, Peng J, Garriga J, Price DH, Grana X, Peterlin BM. 1998. The ability of positive transcription elongation factor B to transactivate human immunodeficiency virus transcription depends on a functional kinase domain, cyclin T1, and Tat. *J Virol*. 72:7154–7159.
- Garber ME, Mayall TP, Suess EM, Meisenhelder J, Thompson NE, Jones KA. 2000. CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA. *Mol Cell Biol*. 20(18):6958-69.
- Garber ME, Wei P, KewalRamani VN, Mayall TP, Herrmann CH, Rice AP, Littman DR, Jones KA. 1998. The interaction between HIV-1 Tat and human cyclin T1 requires zinc and a critical cysteine residue that is not conserved in the murine CycT1 protein. *Genes Dev*. 12:3512–3527.
- Garcia-Perez, J., S. Sanchez-Palomino, M. Perez-Olmeda, B. Fernandez and J. Alcamí. 2007. A new strategy based on recombinant viruses as a tool for assessing drug

- susceptibility of human immunodeficiency virus type 1. *J. Med. Virol.* 79:127-137.
- Gatignol A, Jeang KT. 2000. Tat as a transcriptional activator and a potential therapeutic target for HIV-1. *Adv Pharmacol.* 48:209-27.
- Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. 2004. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4⁺ T cell survival. *J Immunol.* 172(10):6065-73.
- Gendelman HE, Orenstein JM, Baca LM, Weiser B, Burger H, Kalter DC, Meltzer MS. 1989. The macrophage in the persistence and pathogenesis of HIV infection. *AIDS* 3: 475-495.
- Ghosh S, Karin M. 2002. Missing pieces in the NFκB puzzle. *Cell Suppl.* 109:S81–S96.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-κappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-60.
- Giacca M. 2005 HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link?. *Retrovirology.* 7;2:7.
- Gibellini D, Re MC, La Placa M, Zauli G. 2002. Differentially expressed genes in HIV-1 tat-expressing CD4(+) T-cell line. *Virus Res.* 90(1-2):337-45.
- Gibellini D, Re MC, Ponti C, Maldini C, Celeghini C, Cappellini A, La Placa M, Zauli G. 2001. HIV-1 Tat protects CD4⁺ Jurkat T lymphoblastoid cells from apoptosis mediated by TNF-related apoptosis-inducing ligand. *Cell Immunol.* 207(2):89-99.
- Gibellini D, Re MC, Vitone F, Rizzo N, Maldini C, La Placa M, Zauli G. 2003. Selective up-regulation of functional CXCR4 expression in erythroid cells by HIV-1 Tat protein. *Clin Exp Immunol.* 131(3):428-35.
- Gibellini D, Vitone F, Schiavone P, Re MC. 2005. HIV-1 tat protein and cell proliferation and survival: a brief review. *New Microbiol.* 28(2):95-109.
- Gil J, Bermejo M, Alcamí J. 2004. HIV and apoptosis: a complex interaction between cell death and virus survival. *Progress in Molecular and Subcellular Biology* 36, 117-149.

- Gonda MA, Wong-Staal F, Gallo RC, Clements JE, Narayan O, Gilden RV. 1985. Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227: 173-177.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4(12):3665-85. Errata en: *Proteomics* 5(3):826-7.
- Greene WC. 1991. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med.* 324:308-317.
- Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, Dandekar S. 2003. Severe CD4⁺ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy. *J Virol.* 77(21):11708-17.
- Hadley JS, Wang JE, Foster SJ, Thiernemann C, Hinds CJ. 2005. Peptidoglycan of *Staphylococcus aureus* upregulates monocyte expression of CD14, Toll-like receptor 2 (TLR2), and TLR4 in human blood: possible implications for priming of lipopolysaccharide signaling. *Infect Immun.* 73(11):7613-9.
- Hajjar AM, O'Mahony DS, Ozinsky A, Underhill DM, Aderem A, Klebanoff SJ, Wilson CB. 2001. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol.* 166(1):15-9.
- Hamamoto T, Gunji S, Tsuji H, Beppu T. 1983. Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. I. Taxonomy of the producing strain and their fermentation, purification and characterization. *J Antibiot (Tokyo)* 36(6):639-r45.
- Harada S, Koyanagi Y, Yamamoto N. 1985. Infection of HTLV-III/LAV in HTLV-I-carrying cells MT-2 and MT-4 and application in a plaque assay. *Science* 229: 563-566
- Harhaj E, Blaney J, Millhouse S, Sun SC. 1996. Differential effects of I kappa B molecules on Tat-mediated transactivation of HIV-1 LTR. *Virology.* 216:284–287.

- Harrich D, Garcia J, Mitsuyasu R, Gaynor R. 1990. TAR independent activation of the human immunodeficiency virus in phorbol ester stimulated T lymphocytes. *EMBO J.* 9(13):4417-23.
- Harrich D, Ulich C, García-Martínez LF, Gaynor RB. 1997. Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.* 16(6):1224-35.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. 1988. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 52(2):269-79.
- Hauber J, Malim MH, Cullen BR. 1989. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol.* 63(3):1181.
- Haughey NJ, Mattson MP. Calcium dysregulation and neuronal apoptosis by the HIV-1 proteins Tat and gp120. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2002 Oct 1;31 Suppl 2:S55-61.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410(6832):1099-103.
- Hazan U, Thomas D, Alcamí J, Bachelier F, Israel N, Yssel H, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. 1990. Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87:7861-7865.
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 303(5663):1526-9.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408(6813):740-5. Errata en: 409(6820):646.

- Hermankova M, Siliciano JD, Zhou Y, Monie D, Chadwick K, Margolick JB, Quinn TC, Siliciano RF. 2003. Analysis of human immunodeficiency virus type 1 gene expression in latently infected resting CD4⁺ T lymphocytes in vivo. *J Virol.* 77(13):7383-92.
- Hidalgo-Estévez AM, González E, Punzón C, Fresno M. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Tat increases cooperation between AP-1 and NFAT transcription factors in T cells. *J Gen Virol.* 87(Pt 6):1603-12.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-I infection. *Nature* 373:123.
- Holden NS, Squires PE, Kaur M, Bland R, Jones CE, Newton R. Phorbol ester-stimulated NF-kappaB-dependent transcription: Roles for isoforms of novel protein kinase C. *Cell Signal.* 2008 Jul;20(7):1338-48. Epub 2008 Mar 18.
- Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 162(7):3749-52.
- Hottiger MO, Nabel GJ. 1998. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J Virol.* 72(10):8252-6.
- Howard TH, Watts RG. 1994. Actin polymerization and leukocyte function. *Curr Opin Hematol.* 1(1):61-8.
- Howcroft TK, Strebel K, Martin MA, Singer DS. 1993. Repression of MHC class I gene promoter activity by two-exon Tat of HIV. *Science.* 260(5112):1320-2.
- Huang TT, Kudo N, Yoshida M, y Miyamoto S. 2000. A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of IkappaBalpha controls cytoplasmic localization of inactive NF-kappaB/IkappaBalpha complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 97, 1014-1019.

- Ichetovkin I, Grant W, Condeelis J. 2002. Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 12, 79-84.
- Imanishi T, Hara H, Suzuki S, Suzuki N, Akira S, Saito T. 2007. Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions. *J Immunol.* 178(11):6715-9.
- Jeang KT, Berkhout B, Dropulic B. 1993 (a). Effects of integration and replication on transcription of the HIV-1 long terminal repeat. *J Biol Chem.* 268:24940-9.
- Jeang KT, Berkhout B. 1992. Kinetics of HIV-1 long terminal repeat transactivation. Use of intragenic ribozyme to assess rate-limiting steps. *J Biol Chem.* 267:17891-9.
- Jeang KT, Chun R, Lin NH, Gatignol A, Glabe CG, Fan H. 1993 (b). In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J Virol.* 67(10):6224-33.
- Jeang KT, Xiao H., Rich, EA. 1999. Multifaceted activities of the HIV-1 transactivator of transcription, Tat. *J. Biol. Chem.*, 274:, 28837-28840.
- Johnson C, Van Antwerp D y Hope TJ. 1999. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *EMBO J.*, 18, 6682-6693.
- Jones LE, Perelson AS. 2007. Transient viremia, plasma viral load, and reservoir replenishment in HIV-infected patients on antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 45(5):483-93.
- Jordan A, Defechereux P, Verdin E. 2001. The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation. *EMBO J.* 20(7):1726-38.
- Kabelitz D. 2007. Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Curr Opin Immunol.* 19(1):39-45.
- Kamada S, Kusano H, Fujita H, Ohtsu M, Koya RC, Kuzumaki N, Tsujimoto Y. 1998. A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two-hybrid system:

- cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(15):8532-7.
- Karn J. 1999. Tackling Tat. *J Mol Biol*. 293(2):235-54.
- Kawai T, Akira S. 2007. Signalling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*. 13(11):460-9.
- Kiernan RE, Vanhulle C, Schiltz L, Adam E, Xiao H, Maudoux F, Calomme C, Burny A, Nakatani Y, Jeang KT, Benkirane M, Van Lint C. 1999. HIV-1 tat transcriptional activity is regulated by acetylation. *EMBO J*. 18(21):6106-18.
- Kim TA, Avraham HK, Koh YH, Jiang S, Park IW, Avraham S. HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *J Immunol*. 2003 Mar 1;170(5):2629-37.
- Kinoshita S, Su L, Amano M, Timmerman LA, Kaneshima H, Nolan GP. 1997. The T cell activation factor NF-ATc positively regulates HIV-1 replication and gene expression in T cells. *Immunity* 6(3):235-44.
- Klein RS, Rubin JB. 2004. Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol*. 25(6):306-14.
- Kobayashi T, Tani T, Yokota T, Kodama M. 2000. Detection of peptidoglycan in human plasma using the silkworm larvae plasma test. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 28:49-53.
- Koken SE, Greijer AE, Verhoef K, van Wamel J, Bukrinskaya AG, Berkhout B. 1994. Intracellular analysis of in vitro modified HIV Tat protein. *J Biol Chem*. 269(11):8366-75.
- Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. 2004. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9):3029-34.
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. 1997. Caspase-3-generated

- fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 278(5336):294-8.
- Koul D, Yao Y, Abbruzzese JL, Yung WK, Reddy SA. 2001. Tumor suppressor MMAC/PTEN inhibits cytokine-induced NFkappaB activation without interfering with the IkappaB degradation pathway. *J Biol Chem*. 276(14):11402-8.
- Kudo N, Matsumori N, Taoka H, Fujiwara D, Schreiner EP, Wolff B, Yoshida M y Horinouchi S. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(16):9112-7.
- Kulka M, Alexopoulou L, Flavell RA, Metcalfe DD. 2004. Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3. *J Allergy Clin Immunol*. 114(1):174-82.
- Kwok S, Higuchi R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature*. 339(6221):237-8. Errata en: *Nature* 339(6224):490.
- Kwon H, Pelletier N, DeLuca C, Genin P, Cisternas S, Lin R, Wainberg MA, Hiscott J. 1998. Inducible expression of IkappaBalpha repressor mutants interferes with NF-kappaB activity and HIV-1 replication in Jurkat T cells. *J Biol Chem*. 273(13):7431-40.
- Laín de Lera T, Folgueira L, Martín AG, Dargemont C, Pedraza MA, Bermejo M, Bonay P, Fresno M y Alcamí J. 1999. Expression of IkBa in the nucleus of human peripheral blood T lymphocytes. *Oncogene* 18, 1581-1588.
- Lang T, Mansell A. 2007. The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol*. 85(6):425-34.
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. 1986. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*. 136(12):4480-86.

- LaRosa DF, Gelman AE, Rahman AH, Zhang J, Turka LA, Walsh PT. 2007. CpG DNA inhibits CD4⁺CD25⁺ Treg suppression through direct MyD88-dependent costimulation of effector CD4⁺ T cells. *Immunol Lett.* 108(2):183-8.
- Laspias MF, Rice AP, Mathews MB. 1990. Synergy between HIV-1 Tat and adenovirus E1A is principally due to stabilization of transcriptional elongation. *Genes Dev.*, 4:2397-408.
- Lassen K, Han Y, Zhou Y, Siliciano J, Siliciano RF. 2004. The multifactorial nature of HIV-1 latency. *Trends Mol Med.* 10(11):525-31.
- Laster SM, Mackenzie JM Jr. 1996. Bleb formation and F-actin distribution during mitosis and tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Microsc Res Tech.* 34(3):272-80.
- Lee C, Liu QH, Tomkowicz B, Yi Y, Freedman BD, Collman RG. 2003. Macrophage activation through CCR5- and CXCR4- mediated gp120-elicited signaling pathways. *J Leukoc Biol* 2003;74:676–682.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86(6):973-83.
- Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS. 1984. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. *Science* 225: 840-842
- Levy JA. 1993. Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev.* 57:183-289.
- Li CJ, Friedman DJ, Wang C, Meteleev V, Pardee AB. 1995. Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein. *Science.* 1995 268(5209):429-31.
- Li Q, Verma IM. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 725–734.

- Li X, Josef J, Marasco WA. 2001. Hiv-1 Tat can substantially enhance the capacity of NIK to induce IkappaB degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 286(3):587-94.
- Liang WS, Maddukuri A, Teslovich TM, de la Fuente C, Agbottah E, Dadgar S, Kehn K, Hautaniemi S, Pumfery A, Stephan DA, Kashanchi F. 2005. Therapeutic targets for HIV-1 infection in the host proteome. *Retrovirology.* 2:20.
- Lin G, Baribaud F, Romano J, Doms RW, Hoxie JA. 2003. Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol.* 77(2):931-42.
- Lindwasser OW, Chaudhuri R, Bonifacino JS. 2007. Mechanisms of CD4 downregulation by the Nef and Vpu proteins of primate immunodeficiency viruses. *Curr Mol Med.* 7(2):171-84.
- Liou HC, Baltimore D. 1993. Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system. *Curr Opin Cell Biol.* 5(3):477-87.
- Liu J, Perkins ND, Schmid RM, Nabel GJ. 1992. Specific NF-kappa B subunits act in concert with Tat to stimulate human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J Virol.* 66(6):3883-7.
- Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y, Kitajima I, Maruyama I. 2001. Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. *Infect. Immun.* 69:2788-2796.
- Ma G, Greenwell-Wild T, Lei K, Jin W, Swisher J, Hardegen N, Wild CT, Wahl SM. 2004. Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med.* 200(10):1337-46.
- Macián F, Rao A. 1999. Reciprocal modulatory interaction between human immunodeficiency virus type 1 Tat and transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol.* 19(5):3645-53.

- Magnuson DS, Knudsen BE, Geiger JD, Brownstone RM, Nath A. 1995. Human immunodeficiency virus type 1 tat activates non-N-methyl-D-aspartate excitatory amino acid receptors and causes neurotoxicity. *Ann Neurol.* 37(3):373-80.
- Malim MH, Hauber J, Fenrick R, Cullen BR. 1988. Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* 335:181-183.
- Mann DA, Frankel AD. 1991 Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* 10(7):1733-9.
- Mansson A, Adner M, Cardell LO. 2006. Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir Res* 7:36.
- Marzio G, Tyagi M, Gutierrez MI, Giacca M. 1998. HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(23):13519-24.
- Matsuyama A, Arai R, Yashiroda Y, Shirai A, Kamata A, Sekido S, Kobayashi Y, Hashimoto A, Hamamoto M, Hiraoka Y, Horinouchi S, Yoshida M. 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol.* 24(7):841-7. Errata en *Nat Biotechnol.* 24(8):1033.
- McCloskey TW, Ott M, Tribble E, Khan SA, Teichberg S, Paul MO, Pahwa S, Verdin E, Chirmule N. 1997. Dual role of HIV Tat in regulation of apoptosis in T cells. *J Immunol.* 158(2):1014-9.
- McGough A, Pope B, Weeds A. 2001. The ADF/Cofilin family: accelerators of actin reorganization. *Results Probl Cell Differ.* 32:135–154.
- Meier A, Alter G, Frahm N, Sidhu H, Li B, Bagchi A, Teigen N, Streeck H, Stellbrink HJ, Hellman J, van Lunzen J, Altfeld M. 2007. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J Virol.* 81(15):8180-91.

- Moore MJ, Rosbash M. 2001. Cell biology. TAPping into mRNA export. *Science* 294(5548):1841-2.
- Muesing MA, Smith DH, Capon DJ. 1987. Regulation of mRNA accumulation by a human immunodeficiency virus trans-activator protein. *Cell* 48:691–701.
- Nabel G, Baltimore D. 1987. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. *Nature* 326, 711-713.
- Nardelli B, Gonzalez CJ, Schechter M, Valentine FT. 1995. CD4+ blood lymphocytes are rapidly killed in vitro upon contact with autologous HIV infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7312.
- Niikura M, Dornadula G, Zhang H, Mukhtar M, Lingxun D, Khalili K, Bagasra O, Pomerantz RJ. 1996. Mechanisms of transcriptional transactivation and restriction of human immunodeficiency virus type I replication in an astrocytic glial cell. *Oncogene* 13: 313–322.
- Ono S. 2007. Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics. *Int Rev Cytol.* 258:1-82.
- Ott M, Lovett JL, Mueller L, Verdin E. 1998. Superinduction of IL-8 in T cells by HIV-1 Tat protein is mediated through NF-kappaB factors. *J Immunol.* 15;160(6):2872-80.
- Ott M, Schnolzer M, Garnica J, Fischle W, Emiliani S, Rackwitz HR, Verdin E. 1999. Acetylation of the HIV-1 Tat protein by p300 is important for its transcriptional activity. *Curr. Biol.* 9 1489–1492.
- Otte JM, Cario E, Podolsky DK. 2004. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology.* 126(4):1054-70.
- Pancharoen C, Thisyakorn U, Tantawichien T, Jaijaroensup W, Khawplod P, Wilde H. 2001. Failure of pre- and postexposure rabies vaccinations in a child infected with HIV. *Scand J Infect Dis.* 33(5):390-1.

- Pantaleo G, Fauci AS. 1995. New concepts in the immunopathogenesis of HIV infection. *Annu Rev Immunol.* 13:487-512.
- Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS. 1993. The role of lymphoid organs in the pathogenesis of HIV infection. *Semin Immunol.* 5(3):157-63.
- Papakonstanti EA, Stournaras C. 2008. Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett.* 18;582(14):2120-7.
- Parada CA, Roeder RG. 1996. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature.* 384:375–378.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 20(18):3551-67.
- Persaud D, Pierson T, Ruff C, Finzi D, Chadwick KR, Margolick JB, Ruff A, Hutton N, Ray S, Siliciano RF. 2000. A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4(+) T lymphocytes in infected children. *J Clin Invest.* 105(7):995-1003.
- Peruzzi F. 2006. The multiple functions of HIV-1 Tat: proliferation versus apoptosis. *Front Biosci.* 11:708-17.
- Piller SC, Caly L, Jans DA. 2003. Nuclear import of the pre-integration complex (PIC): the Achilles heel of HIV?. *Curr Drug Targets.* 4(5):409-29.
- Pivarcsi A, Bodai L, Réthi B, Kenderessy-Szabó A, Koreck A, Széll M, Beer Z, Bata-Csörgő Z, Magócsi M, Rajnavölgyi E, Dobozy A, Kemény L. 2003. Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int Immunol.* 6):721-30.
- Pocernich CB, Boyd-Kimball D, Poon HF, Thongboonkerd V, Lynn BC, Klein JB, Calebrese V, Nath A, Butterfield DA. 2005. Proteomics analysis of human astrocytes expressing the HIV protein Tat. *Brain Res Mol Brain Res.* 133(2):307-16.

- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545-576.
- Pomerantz RJ. 1999. HIV patients receiving HAART therapy can still transmit the virus. Highly active antiretroviral chemotherapy. *Am Fam Physician.* 59(10):2855.
- Pomerantz RJ. 1999. Residual HIV-1 disease in the era of highly active antiretroviral therapy. *N. Engl. J. Med.*, 340, 1672-1674.
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. 1984. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 224: 497-500.
- Psallidopoulos MC, Schnittman SM, Thompson LM 3rd, Baseler M, Fauci AS, Lane HC, Salzman NP. 1989. Integrated proviral human immunodeficiency virus type 1 is present in CD4+ peripheral blood lymphocytes in healthy seropositive individuals. *J Virol.* 63:4626-4631.
- Puca A, Fiume G, Palmieri C, Trimboli F, Olimpico F, Scala G, Quinto I. 2007. IkappaB-alpha represses the transcriptional activity of the HIV-1 Tat transactivator by promoting its nuclear export. *J Biol Chem.* 21;282(51):37146-57.
- Pugliese A, Torre D, Cantamessa C, Saini A, Pes M, Savarino A. 2000. Multifunctional activity of recombinant p14 on lymphoid cell cultures. *Cancer Detect Prev.* 24(1):46-52.
- Pugliese A, Vidotto V, Beltramo T, Petrini S, Torre D. A review of HIV-1 Tat protein biological effects. 2005. *Cell Biochem Funct.* 23(4):223-7.
- Purvis SF, Jacobberger JW, Sramkoski RM, Patki AH, Lederman MM. 1995. HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 11(4):443-50.
- Quinto I, Mallardo M, Baldassarre F, Scala G, Englund G, Jeang KT. 1999. Potent and stable attenuation of live-HIV-1 by gain of a proteolysis-resistant inhibitor of NF-

- kappaB (IkappaB-alphaS32/36A) and the implications for vaccine development. 1: J Biol Chem. 274(25):17567-72.
- Rabilloud T. 1998. Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis. Electrophoresis. 19(5):758-60.
- Raha T, Cheng SW, Green MR. 2005. HIV-1 Tat stimulates transcription complex assembly through recruitment of TBP in the absence of TAFs. PLoS Biol. 3:e44.
- Re F, Strominger JL. 2004. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. J Immunol. 173:7548-7555.
- Renia L, Potter SM. 2006. Co-infection of malaria with HIV: an immunological perspective. Parasite Immunol. 28:589-595.
- Rescher U, Gerke V. 2004. Annexins--unique membrane binding proteins with diverse functions. J Cell Sci. 117(Pt 13):2631-9.
- Rieckmann P, Poli G, Fox CH, Kehrl JH, Fauci AS. 1991. Recombinant gp120 specifically enhances tumor necrosis factor-alpha production and Ig secretion in B lymphocytes from HIVinfected individuals but not from seronegative donors. J Immunol 147:2922-2927.
- Ritter M, Mennerich D, Weith A, Seither P. 2005. Characterization of Toll-like receptors in primary lung epithelial cells: strong impact of the TLR3 ligand poly(I:C) on the regulation of Toll-like receptors, adaptor proteins and inflammatory response. J Inflamm (Lond). 2:16.
- Rodríguez MS, Michalopoulos I, Arenzana-Seisdedos F, Hay RT. 1995. Inducible degradation of Ikbα in vitro and in vivo requires the acidic C-terminal domain of the protein. Mol Cell Biol 15:2413-2419.
- Romanchikova N, Ivanova V, Scheller C, Jankevics E, Jassoy C, Serfling E. 2003. NFAT transcription factors control HIV-1 expression through a binding site downstream of TAR region. Immunobiology. 208(4):361-5.

- Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. 1999. I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.*, 274, 30353–30356.
- Samstag Y, Eibert SM, Klemke M, Wabnitz GH. 2003. Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J Leukoc Biol.* 73(1):30-48.
- Sánchez-Madrid F, del Pozo MA. 1999. Leukocyte polarization in cell migration and immune interactions. *EMBO J.* 18(3):501-11.
- Sax P, Singer M. 1996. Routine immunization in HIV: helpful or harmful?. *AIDS Clin Care.* 8(2):11-3, 15.
- Scheller C, Ullrich A, McPherson K, Hefele B, Knöferle J, Lamla S, Olbrich AR, Stocker H, Arasteh K, ter Meulen V, Rethwilm A, Koutsilieri E, Dittmer U. 2004. CpG oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells. *J Biol Chem.* 279(21):21897-902.
- Schmid JA, Birbach A, Hofer-Warbinek R, Pengg M, Burner U, Furtmuller PG, Binder BR, de Martin R. 2000. Dynamics of NF kappa B and Ikappa Balpha studied with green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. Investigation of GFP-p65 binding to DNA by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 275:17035-17042.
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* 19: 621-626
- Schulze-Forster K, Götz F, Wagner H, Kröger H, Simon D. 1990. Transcription of HIV1 is inhibited by DNA methylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 168(1):141-7.
- Schwartz O, Virelizier JL, Montagnier L, Hazan U. 1990. A microtransfection method using the luciferase-encoding reporter gene for the assay of human immunodeficiency virus LTR promoter activity. *Gene* 88:197-205.

- Selby MJ, Bain ES, Luciw PA, Peterlin BM. 1989. Structure, sequence, and position of the stem-loop in tat determine 113 transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev.* 3:547–58.
- Serrador JM, Vicente-Manzanares M, Calvo J, Barreiro O, Montoya MC, Schwartz-Albiez R, Furthmayr H, Lozano F, Sánchez-Madrid F. 2002. A novel serine-rich motif in the intercellular adhesion molecule 3 is critical for its ezrin/radixin/moesin-directed subcellular targeting. *J Biol Chem.* 277(12):10400–9.
- Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, Mortensen P, Shevchenko A, Boucherie H, Mann M. 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(25):14440–5.
- Sieling PA, Chung W, Duong BT, Godowski PJ, Modlin RL. 2003. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *J Immunol.* 170(1):194–200.
- Simmons A, Aluvihare V, McMichael A. 2001. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* 14:763–777.
- Steffan NM, Bren GD, Frantz B, Tocci MJ, O'Neill EA, Paya CV. Regulation of I κ B alpha phosphorylation by PKC- and Ca(2+)-dependent signal transduction pathways. 1: *J Immunol.* 1995 Nov 15;155(10):4685–91.
- Stevenson M, Stanwick TL, Dempsey MP, Lamonica CA. 1990. HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* 9(5):1551–60.
- Sun H, Lin K, Yin HL. 1997. Gelsolin modulates phospholipase C activity in vivo through phospholipid binding. *J Cell Biol.* 25;138(4):811–20.
- Sundstrom JB, Little DM, Villinger F, Ellis JE, Ansari AA. 2004. Signaling through Toll-like receptors triggers HIV-1 replication in latently infected mast cells. *J. Immunol.* 172:4391–4401.

- Swingler S, Mann A, Jacque J, Brichacek B, Sasseville VG, Williams K, et al. HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages. *Nat Med* 1999;5:103–997.
- Takeda K, Akira S. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 16(1):3-9.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. 2003. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 21:335-76.
- Takeuchi OK, Hoshino K, Akira S. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J. Immunol*. 165:5392-5396.
- Theriot JA. 1997. Accelerating on a Treadmill: ADF/Cofilin Promotes Rapid Actin Filament Turnover in the Dynamic Cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology*, 136 (6): 1165–1168.
- Thiagarajan P, Tait JF. 1990. Binding of annexin V/placental anticoagulant protein I to platelets. Evidence for phosphatidylserine exposure in the procoagulant response of activated platelets. *J Biol Chem*. 265(29):17420-3.
- Thibault S, Tardif MR, Barat C, Tremblay MJ. 2007. TLR2 signalling renders quiescent naive and memory CD4+ T cells more susceptible to productive infection with X4 and R5 HIV-type 1. *J Immunol* 179(7):4357-66.
- Thoma-Uszynski S, Kiertscher SM, Ochoa MT, Bouis DA, Norgard MV, Miyake K, Godowski PJ, Roth MD, Modlin RL. 2000. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol*. 165(7):3804-10.
- Tobin NH, Learn GH, Holte SE, Wang Y, Melvin AJ, McKernan JL, Pawluk DM, Mohan KM, Lewis PF, Mullins JJ, Frenkel LM. 2005. Evidence that low-level viremias during effective highly active antiretroviral therapy result from two processes: expression of archival virus and replication of virus. *J Virol*. 79(15):9625-34.
- Ullman KS, Powers MA, Forbes DJ. 1997. Nuclear export receptors: from importin to exportin. *Cell* 90(6):967-70.

- Urbinati C, Bugatti A, Giacca M, Schlaepfer D, Presta M, Rusnati M. 2005. $\alpha(v)\beta_3$ -integrin-dependent activation of focal adhesion kinase mediates NF- κ B activation and motogenic activity by HIV-1 Tat in endothelial cells. *J Cell Sci.* 118(Pt 17):3949-58.
- Van Lint C, Emiliani S, Ott M, Verdin E. 1996. Transcriptional activation and chromatin remodeling of the HIV-1 promoter in response to histone acetylation. *EMBO J.* 15(5):1112-20.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. 1995. Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev.*, 15;9(22):2723-35.
- Vetter J. 1998. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon.* 36(1):13-24.
- Virelizier JL. 1990. Cellular activation and human immunodeficiency virus infection. *Curr Opin Immunol.* 2(3):409-13.
- Waisman DM. 1995. Annexin II tetramer: structure and function. *Mol Cell Biochem.* 149-150:301-22.
- Wang JE, Dahle MK, McDonald M, Foster SJ, Aasen AO, Thiemermann C. 2003. Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock* 20:402-414.
- Wang JP, Liu P, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW, Libraty DH. 2006. Flavivirus activation of plasmacytoid dendritic cells delineates key elements of TLR7 signaling beyond endosomal recognition. *J Immunol.* 177(10):7114-21.
- Wang WK, Chen MY, Chuang CY, Jeang KT, Huang LM. 2000. Molecular biology of human immunodeficiency virus type 1. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 33: 131-140.
- Watson K, Edwards RJ. 1999. HIV-1-trans-activating (Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches. *Biochem Pharmacol.* 58(10):1521.

- Wei P, Garber ME, Fang SM, Fischer WH, Jones KA. 1998. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell*. 92(4):451-62.
- Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, Johnson VA, Emini EA, Deutsch P, Lifson JD, Bonhoeffer S, Nowak MA, Hahn BH. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type I infection. *Nature* 373: 11 7.
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, Debatin KM, Krammer PH. 1995 (a). Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature*. 375(6531):497-500.
- Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, Krammer PH, Dröge W, Lehmann V. 1995 (b). HIV-1 Tat potentiates TNF-induced NF- κ B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J*. 14:546–554.
- Williams SA, Greene WC. 2007. Regulation of HIV-1 latency by T-cell activation. *Cytokine*. 39(1):63-74.
- Wong JK, Hezareh M, Günthard HF, Havlir DV, Ignacio CC, Spina CA, Richman DD. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science* 278(5341):1291-5.
- Wu RF, Gu Y, Xu YC, Mitola S, Bussolino F, Terada LS. 2004. Human immunodeficiency virus type 1 Tat regulates endothelial cell actin cytoskeletal dynamics through PAK1 activation and oxidant production. *J Virol*. 78(2):779-89.
- Xu D, Liu H, Komai-Koma M. 2004. Direct and indirect role of Toll-like receptors in T cell mediated immunity. *Cell Mol Immunol*. 1(4):239-46.
- Yang Y, Tikhonov I, Ruckwardt TJ, Djavani M, Zapata JC, Pauza CD, Salvato MS. Monocytes treated with human immunodeficiency virus Tat kill uninfected CD4(+) cells by a tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism. *J Virol*. 2003 Jun;77(12):6700-8.

- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61(2):213-22.
- Zamborlini A, Lehmann-Che J, Clave E, Giron ML, Tobaly-Tapiero J, Roingeard P, Emiliani S, Toubert A, de Thé H, Saïb A. 2007. Centrosomal pre-integration latency of HIV-1 in quiescent cells. *Retrovirology*. 10;4:63.
- Zauli G, Gibellini D. 1996. The human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein and Bcl-2 gene expression. *Leuk Lymphoma*. 23(5-6):551-60.
- Zhang Z, Schuler T, Zupancic M, Wietgreffe S, Staskus KA, Reimann KA, Reinhart TA, Rogan M, Cavert W, Miller CJ, Veazey RS, Notermans D, Little S, Danner SA, Richman DD, Havlir D, Wong J, Jordan HL, Schacker TW, Racz P, Tenner-Racz K, Letvin NL, Wolinsky S y Haase AT. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. (1999). *Science*, 286, 1353-1357.
- Zhang ZQ, Wietgreffe SW, Li Q, Shore MD, Duan L, Reilly C, Lifson JD y Haase AT. 2004. Roles of substrate availability and infection of resting and activated CD4+ T cells in transmission and acute simian immunodeficiency virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5640-5645.
- Zhong H, May MJ, Jimi E, Ghosh S. 2002. The phosphorylation status of nuclear NF- κ B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* 9, 625–636.
- Zhou M, Halanski MA, Radonovich MF, Kashanchi F, Peng J, Price DH, Brady JN. 2000. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol and Cell Biol*. 20:5077–5086.